



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 14 DEC. 2006

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DUPLICATA
DE LA REQUÊTE

DEMANDE DE
(voir case cochée)

a	<input checked="" type="checkbox"/>	BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/>	CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/>	CERTIFICAT D'ADDITION
d	<input type="checkbox"/>	DEMANDE DIVISIONNAIRE
e	<input type="checkbox"/>	TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

Pour c, d, e préciser : Nature, N° et date
de la demande initiale ou principale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRE
DE L'AVIS DOCUMENTAIRE*

OUI

NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON
ET SI LE DEMANDEUR EST
UNE PERSONNE PHYSIQUE IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA TAXE
D'AVIS DOCUMENTAIRE *

OUI

NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE OU PRINCIPALE

ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD
3 RUE CHAUVÉAU-LAGARDE
75008 PARIS

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

91 01286 -

DATE DE DÉPÔT

05 FEV. 1991

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

4 DATE DU POUVOIR GÉNÉRAL

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

CDM 1461

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

47.42.82.82

7 TITRE DE L'INVENTION

SEQUENCES PEPTIDIQUES SPECIFIQUES DES STADES HEPATiques DE P. FALCIPARUM
PORTEUSES D'EPITOPES CAPABLES DE STIMULER LES LYMPHOCYTES T.

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

INSTITUT PASTEUR

Fondation privée reconnue d'Utilité Publique

N° SIREN, LE CAS ÉCHEANT

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

25-28 rue du Dr. Roux
75724 PARIS CEDEX 15 (France)

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

Française

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR*

OUI

NON

Si la réponse est non voir notice explicative

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PER-
SONNE PHYSIQUE NON IMPOSABLE,
IL REQUIERT* OU A REQUIS LA
REDUCTION DES TAXES*.

OUI

NON

DE DÉPÔT

TAXES VERSÉES

D'AVIS DOCUMENTAIRE

DE REVENDICATION DE PRIORITE

DE REVENDICATION (à partir de la 11e)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

PAYS ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ADDITIONS

ANTÉRIEURES A LA N°
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE

ERNEST GUTMANN/YVES PLASSERAUD S.A.

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ A LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

B 1461

N° d'enregistrement national

9101286

Titre de l'invention :

**SEQUENCES PEPTIDIQUES SPECIFIQUES DES STADES HEPATIQUES DE
P. FALCIPARUM PORTEUSES D'EPITOPES CAPABLES DE STIMULER LES
LYMPHOCYTES T.**

Le (s) soussigné (s)

**ERNEST GUTMANN - YVES
PLASSERAUD S.A.
67 boulevard Haussmann
75008 PARIS (France)**

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (nom, prénoms, adresse)

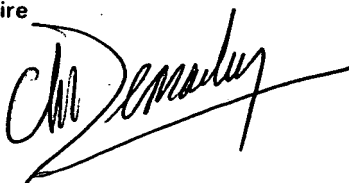
**GUERIN-MARCHAND Claudine
44, rue du Fecamp
75012 PARIS (France)**

**DRUILHE Pierre
6bis, rue d'Auteuil
75016 PARIS (France)**

Date et **21 FEVRIER 1991**

signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

**ERNEST GUTMANN - YVES
PLASSERAUD S.A.**



DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
25 à 50		51	X	16/05/91	21 MAI 1991 C J

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

BT 244 / 171180

SEQUENCES PEPTIDIQUES SPECIFIQUES DES STADES
HEPATIQUES DE P. FALCIPARUM PORTEUSES D'EPITOPES
CAPABLES DE STIMULER LES LYMPHOCYTES T.

Les parasites responsables du paludisme chez l'homme, dont notamment Plasmodium falciparum ou Plasmodium vivax pour ne citer que les principaux d'entre eux, présentent chez l'hôte humain des morphologies différentes et expriment des antigènes différents en fonction de leur localisation dans l'organisme de l'hôte infecté. Les différences morphologiques et antigéniques de ces parasites au cours de leurs cycles de vie chez l'homme, permettent de définir au moins quatre stades de développement distincts.

Le tout premier stade de développement du parasite chez l'homme correspond à la forme sporozoïte introduite dans le sang de l'hôte, par piqûres d'insectes porteurs du parasite. Le second stade correspond au passage du parasite dans le foie et à l'infection des cellules hépatiques dans lesquelles les parasites se développent pour former les schizontes hépatiques qui libèrent par éclatement les mérozoïtes hépatiques. Le troisième stade est caractérisé par l'infection des érythrocytes sanguins par les formes asexuées (mérozoïtes) du parasite ; ce stade érythrocytaire de développement du parasite correspond à la phase pathogène de la maladie.

Le quatrième stade correspond à la formation des formes sexuées (ou gamétocytes) qui deviendront les gamètes extra-cellulaires chez le moustique.

On sait que de nombreuses études ont été entreprises pour isoler à partir des souches de parasites infectantes pour un hôte humain des

fractions polypeptidiques, d'une part pour assurer le diagnostic in vitro du paludisme par détection des anticorps correspondants, et, d'autre part, pour tenter de vacciner contre le paludisme.

Par exemple, des banques de CADNs (ADN complémentaires) clonés dérivés des sporozoïtes de Plasmodium falciparum ont été établies par ENEA et coll (1984) Science, vol. 225, 628-630. Il a été reconnu que ces banques comportaient des clones susceptibles d'exprimer des polypeptides immunogéniques contenant des unités répétitives de 4 acides aminés spécifiques de l'antigène circumsporozoïtaire (de P. falciparum).

Toutefois, peu de travaux ont été effectués sur les formes hépatiques des parasites responsables du paludisme. La morphologie des formes hépatiques a été décrite pour la première fois en 1948 à partir de biopsies de volontaires humains infectés (Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 41, 785 (1948)). Un antigène spécifique du stade hépatique de P. falciparum a pu être décrit dans le foie de singes d'Amérique du Sud insensibles aux formes sanguines du parasite, mais chez lesquels les formes hépatiques peuvent se développer (Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, (3) 336-341 (1984)).

La détection de la localisation des antigènes spécifiques du parasite lorsqu'il est au stade hépatique (ci-après désigné par LS antigènes pour "Liver Stage" antigènes) a été réalisée par immunofluorescence tout au long des étapes de maturation du schizonte. Ils sont localisés à la périphérie du parasite de taille 5 à 40 microns ; par la suite ils sont distribués entre les cytomères ou paquets de mérozoïtes, lorsque les schizontes

atteignent entre 50 et 100 microns. Ils se distinguent des antigènes de surface des sporozoïtes et des antigènes partagés par les schizontes du sang et du foie qui donnent une image d'immunofluorescence interne au parasite.

Bien qu'il soit désormais possible de cultiver des formes hépatiques de P.falciparum dans des hépatocytes humains (Science, 227, 440 (1985)), le faible taux d'obtention de formes matures du parasite par les méthodes de culture in vitro et in vivo ne permet pas l'analyse biochimique de l'antigène produit au stade hépatique.

Il a également été observé que les individus atteints de paludisme possèdent un taux d'anticorps dirigés contre les LS antigènes très élevés. Les LS antigènes semblent être des immunogènes très puissants, parmi les plus puissants de tous les antigènes synthétisés aux différents stades de développement du parasite.

Un des buts de la présente invention est précisément de disposer de nouvelles compositions pour la vaccination chez l'homme contre le paludisme provoqué par P. falciparum.

L'invention a également pour objet le diagnostic in vitro de l'infection d'un individu par P. falciparum dans des conditions plus sensibles qu'il ne le permettent les méthodes actuelles.

Une molécule exprimée spécifiquement au cours de la phase hépatique a été identifiée par criblage avec des sérums polyclonaux d'une banque d'ADN génomique clonée dans un vecteur d'expression (GUERIN-MARCHAND, C. et al ; Nature, 329, 164-167, (1987)). Cette molécule représente une partie d'un antigène appelé

LSA (Liver Stage Specific antigen), et est constituée de motifs répétitifs de 17 acides aminés et semble très immunogène dans les conditions naturelles d'exposition à la maladie.

Ces motifs répétitifs de 17 acides aminés sont représentés par la formule :

Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg

dans laquelle X est Glu ou Gly.

L'invention a pour objet des séquences peptidiques spécifiques des stades hépatiques de P. falciparum porteuses d'épitopes capables de stimuler les lymphocytes T (en particulier les lymphocytes T cytotoxiques).

L'invention concerne plus particulièrement des molécules, ou compositions peptidiques ou polypeptidiques, caractérisées par la présence dans leur structure d'une ou de plusieurs séquences peptidiques porteuses de tout ou partie d'un ou plusieurs épitope(s) T (épitopes impliqués dans la stimulation des lymphocytes T), et le cas échéant d'autres épitopes, notamment des épitopes B (épitopes correspondant aux anticorps produits par des lymphocytes B), caractéristiques des protéines résultant de l'activité infectieuse de P. falciparum dans les cellules hépatiques.

Il sera fait référence dans ce qui suit aux dessins dans lesquels:

- la figure 1 représente une protéine recombinante de 316 acides aminés de l'invention, désignée ci-après par antigène 536 ou protéine LSA-R-NR,
- la figure 2 fournit la séquence nucléotidique d'un des acides nucléiques recombinants étudiés (clone DG536) et codant pour le polypeptide LSA-R-NR,

- la figure 3 représente un polypeptide de 151 acides aminés de l'invention, désigné ci-après par antigène 729S,

- la figure 4 correspond à la séquence nucléotidique du clone DG729S codant pour le polypeptide de la figure 3 (adaptateurs Eco RI en gras).

Ainsi la présente invention concerne toute molécule, ou composition polypeptidique, comportant au moins une séquence peptidique porteuse de tout ou partie d'un, ou plusieurs, épitopes caractéristiques d'une protéine produite dans les hépatocytes infectés par P. falciparum, et plus particulièrement porteuse de tout ou partie d'un ou plusieurs épitope(s) T des protéines produites au stade hépatique de P. falciparum, caractérisée en ce que cette séquence peptidique est représentée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

RKADTKKNLERKKEHGDILAEDLYGRLEIPAIELPS

ENERGYIYPHQSSLPQDNRGNSRDSKEISIIIEKTNR

ESITTNVEGRRDIHKHLEEKKGDSIKPEQKEDKS

cet enchaînement d'acides aminés étant, le cas échéant, précédé par toute ou partie d'un ou plusieurs des enchaînements de 17 acides aminés de formule :

$X_1DLEQX_2RX_3AKEKLQX_4QQ$

$QX_1DLEQX_2RX_3AKEKLQX_4Q$

$QQX_1DLEQX_2RX_3AKEKLQX_4$

$X_4QQX_1DLEQX_2RX_3AKEKLQ$

$QX_4QQX_1DLEQX_2RX_3AKEKL$

$LQX_4QQX_1DLEQX_2RX_3AKEK$

$KLQX_4QQX_1DLEQX_2RX_3AKE$

$EKLQX_4QQX_1DLEQX_2RX_3AK$

$KEKLQX_4QQX_1DLEQX_2RX_3A$

$AKEKLQX_4QQX_1DLEQX_2RX_3$

X_3 AKEKLQX $_4$ QQX $_1$ DLEQX $_2$ R
 RX_3 AKEKLQX $_4$ QQX $_1$ DLEQX $_2$
 X_2RX_3 AKEKLQX $_4$ QQX $_1$ DLEQ
 QX_2RX_3 AKEKLQX $_4$ QQX $_1$ DLE
 EQX_2RX_3 AKEKLQX $_4$ QQX $_1$ DL
 $LEQX_2RX_3$ AKEKLQX $_4$ QQX $_1$ D
 $DLEQX_2RX_3$ AKEKLQX $_4$ QQX $_1$

dans laquelle :

- . X_1 est "Ser" ou "Arg",
- . X_2 est "Glu" ou "Asp",
- . X_3 est "Arg" ou "Leu",
- . X_4 est "Glu" ou "Gly".

Ainsi la présente invention concerne notamment la séquence peptidique représentée sur la figure 1. Cette séquence est constituée de 316 acides aminés. A l'extrémité 5' se trouvent 209 acides aminés organisés en répétitions de 17 acides aminés répondant aux formules indiquées ci-dessus. Du côté 3', on trouve une partie non répétée de 107 acides aminés.

L'invention concerne plus particulièrement tout polypeptide caractérisé par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

LQEQQRDLEQRKADTKKNLERKKKEHGDILAEDLYGRLEIPAIELPSENERGY
 YYPHQSSLPQDNRGNSRDSKEISIIIEKTNRESITTNVEGRRDIHKGHLEEKKDG
 SIKPEQKEDKS

Un polypeptide préféré de l'invention est représenté par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

DTKKNLERKKKEHGDILAEDLYGRLEIP

(ce polypeptide étant désigné ci-après par l'expression LSA-NR (LSA-non répété), ou encore par toute séquence issue de l'enchaînement précédent et modifiée par substitution de 40 % maximum des acides

aminés et conservant son activité physiologique telle que l'induction d'une réponse des lymphocytes T en particulier des lymphocytes T cytotoxiques.

Une autre molécule polypeptidique particulièrement préférée de l'invention est caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

ERRAKEKLQEQQRDLEQRKADTKK

(ce polypeptide étant désigné ci-après par l'expression LSA-J, ou LSA-jonction, car il est situé à cheval entre la partie répétée et la partie non répétée de la molécule représentée sur la figure 1).

Ces deux derniers polypeptides sont plus particulièrement avantageux en raison de leur amphipaticité les caractérisant, ainsi que de leur conformation tridimensionnelle selon des prédictions réalisées par la technique de Chou et Fassmann.

L'invention a également pour objet toute molécule, ou composition polypeptidique, comportant au moins une séquence peptidique porteuse de tout ou partie d'un ou plusieurs épitopes caractéristiques d'une protéine produite au niveau des stades sporozoïte, hépatique et sanguin (erythrocytaire) de P. falciparum, et plus particulièrement porteuse d'un ou plusieurs épitopes T, caractérisée en ce que cette séquence peptidique est représentée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDIFNSLVKSVQQEQQHNVEEKVE
ESVEENDEESVEENVEENVEENDDGSVASSVEESIASSVDESIDSSIEENVAP
TVEEIVAPTVEEIVAPSVVEKCAPSVVEESVAPSVVEESVAEMLKER

représenté sur la figure 3 et désigné ci-après par le polypeptide 729S.

L'invention a plus particulièrement pour objet la séquence en acides aminés issue de la séquence précédente et caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVND DIFNSLVKSVQQEQQHN

D'une manière générale, par toute ou partie d'une séquence peptidique de l'invention, on entend tout enchaînement comprenant au moins 4 à 5 acides aminés jusqu'au nombre maximal d'acides aminés des séquences décrites ci-dessus.

Il va de soi que les fonctions réactives libres que sont susceptibles de posséder certains acides aminés entrant dans la constitution des molécules selon l'invention, notamment les groupes carboxyles libres portés par les groupes Glu ou par l'acide aminé C-terminal, d'une part, et/ou les groupes libres portés par l'acide aminé N-terminal ou par des acides aminés intérieurs à la chaîne peptidique, par exemple Lys, d'autre part peuvent être modifiées, dès lors que cette modification n'entraîne pas une modification des propriétés antigéniques, le cas échéant immunogénique, de l'ensemble de la molécule. Les molécules ainsi modifiées entrent naturellement dans le cadre de la protection donnée à l'invention par les revendications. Ces fonctions carboxyles sont éventuellement acylées ou estérifiées.

D'autres modifications entrent également dans le cadre de l'invention. En particulier, les fonctions amine ou ester, ou les deux à la fois, des acides aminés terminaux peuvent être engagées elles-mêmes dans des liaisons avec d'autres acides aminés. Par exemple l'acide N-terminal peut être lié à une séquence comprenant de 1 à plusieurs acides aminés correspondant à une partie de la région C-terminale

d'un autre peptide conforme à la définition qui en a été donnée plus haut, ou vice-versa.

Il va de soi également que toute séquence peptidique issue de la modification, par substitution et/ou par addition et/ou suppression d'un ou plusieurs acides aminés, d'une des séquences peptidiques décrites ci-dessus, entre dans le cadre de la protection donnée à l'invention par les revendications, dès lors que cette modification n'altère pas les propriétés antigéniques ou immunogéniques des polypeptides de l'invention, notamment lorsque ces propriétés immunogènes ont été renforcées de façon adéquate, par exemple par association de ces polypeptides avec un adjuvant immunologique approprié (par exemple un muramylpeptide) ou par couplage avec une molécule porteuse de poids moléculaire plus élevé (par exemple une sérum-albumine ou une poly-lysine) ou une toxine du type tétanique ou un autre antigène de P.falciparum.

Plus particulièrement, l'invention concerne toute séquence peptidique dérivée des séquences peptidiques sus-mentionnées, et présentant des modifications par substitution de 40 % au maximum des acides aminés tout en conservant l'activité biologique des séquences de l'invention, à savoir notamment l'induction d'une réponse des lymphocytes T, en particulier des lymphocytes T cytotoxiques.

L'invention concerne plus généralement toute molécule caractérisée par la présence dans sa structure d'une ou plusieurs séquences peptidiques présentant des réactions immunologiques croisées avec les séquences peptidiques répondant aux formules

précédentes vis-à-vis des anticorps inductibles par ces dernières in vivo.

L'invention concerne également toute séquence de nucléotides codant pour un polypeptide de l'invention et plus particulièrement toute séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à une des séquences en acides aminés de l'invention.

L'invention a plus particulièrement pour objet la séquence nucléotidique constituée des 951 nucléotides représentés sur la figure 2, et codant pour le polypeptide de 316 acides aminés (encore désigné ci-après par la protéine recombinante LSA-R-NR) sus-mentionné représenté sur la figure 1.

L'invention concerne aussi les séquences nucléotidiques codant pour des sous-séquences peptidiques de l'invention. On citera notamment les séquences nucléotidiques délimitées par les nucléotides situés aux positions 630 à 949, 597 à 648 (codant pour le peptide LSA-J), ou 640 à 717 (codant pour le peptide LSA-NR) de la figure 2.

L'invention vise également tout ou partie de la séquence nucléotidique de la figure 4 codant pour tout ou partie de la séquence peptidique 729S représentée sur la figure 3.

L'invention concerne également toute séquence de nucléotides codant pour un polypeptide identique, ou analogue, tant du point de vue de la structure que des caractéristiques antigéniques, à ceux de l'invention, cette séquence étant capable de s'hybrider avec tout ou partie de la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 597 à 949 de la figure 2, ou avec tout ou partie de la séquence nucléotidique de la figure 4

ou les séquences complémentaires de ces dernières, dans les conditions suivantes :

- pré-traitement (pré-hybridation) du filtre de nitrocellulose supportant le fragment d'acide nucléique à tester avec le tampon d'hybridation, (composé de 6 SSC, 5x Denhard's, 0,5 % SDS, 100µg/l DNA de sperme de saumon soniqué dénaturé) cette opération étant effectuée à 65°C pendant 1 heure;
- remplacement du tampon d'hybridation au contact du support, sur lequel le fragment d'acide nucléique est alors fixé, par du tampon d'hybridation de même composition, et addition de la séquence sus-mentionnée de la figure 2 ou de la figure 4 en tant que sonde, notamment marquée radioactivement, et préalablement dénaturée ;
- incubation dudit fragment d'acide nucléique fixé sur le support dans ce tampon d'incubation avec la séquence sus-mentionnée de la figure 2 ou de la figure 4 à 65°C pendant une durée d'environ à 1 heure ;
- l'élimination du tampon contenant la sonde non fixée, par 2 lavages successifs de 30 minutes chacun avec une solution tampon composée de 2 x SSC, et 0,5 % SDS à 65°C.

Il est à rappeler que 20 x SSC = 175,3 g NaCl, 88,2 g Tricitrate de Sodium/l, PH 7 ; Denhard's 50 x = Ficoll 400 5 g, Polyvinil pyrrolidone 5 g, BSA (sérum albumine de boeuf) fraction V 5 g/500 ml ; le SDS est le sodium dodécyl sulfate.

L'invention a également pour objet tout acide nucléique recombinant contenant au moins une séquence de nucléotides de l'invention, insérée dans un acide nucléique hétérologue vis-à-vis de ladite séquence de nucléotides.

L'invention concerne plus particulièrement un acide nucléique recombinant tel que défini ci-dessus, dans lequel la séquence de nucléotides de l'invention est précédée d'un promoteur (notamment un promoteur inductible) sous le contrôle duquel la transcription de ladite séquence est susceptible d'être effectuée et, le cas échéant, suivie d'une séquence codant pour des signaux de terminaison de la transcription.

L'invention concerne tout vecteur recombinant, utilisé en particulier pour le clonage d'une séquence nucléotidique de l'invention, et/ou l'expression du polypeptide codé par cette séquence, et caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique recombinant, tel que défini ci-dessus, en l'un de ses sites non essentiel pour sa répllication.

A titre d'exemple de vecteur sus-mentionné, on citera les plasmides, les cosmides, ou les phages.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement le plasmide DG536 déposé à la CNCM sous le n°I-1027 le 17 janvier 1991, ainsi que le plasmide DG729S déposé à la CNCM sous le n°I-1028 le 17 janvier 1991.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un polypeptide de l'invention, par transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur recombinant de type sus-indiqué, suivie de la mise en culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé, et de la récupération du polypeptide dans le milieu de culture.

Ainsi, l'invention concerne tout hôte cellulaire transformé par un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus, et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence de nucléotides codant pour un polypeptide selon l'invention.

L'invention a plus particulièrement pour objet des amorces d'ADN (ou d'ARN) utilisables dans le cadre de la synthèse de séquences nucléotidiques et/ou polypeptides selon l'invention, par la technique du PCR (Polymerase Chain Reaction) telle que décrite dans les brevets américains n° 4,683,202 et n°4,683,195 et de la demande de brevet européenne n° 200.362 (PCR = amplification en chaîne de l'ADN).

L'invention concerne toute amorce d'ADN ou d'ARN, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'environ 10 à 25 nucléotides, identiques aux 10 à 25 premiers nucléotides de la séquence de nucléotides codant pour une séquence peptidique selon l'invention ou identiques aux 10 à 25 derniers nucléotides de ladite séquence.

L'invention concerne également toute amorce d'ADN ou d'ARN, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'environ 10 à 25 nucléotides complémentaires des 10 à 25 premiers nucléotides de la séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique selon l'invention ou complémentaire des 10 à 25 derniers nucléotides de ladite séquence de nucléotides.

L'invention a également pour objet toute amorce d'ADN ou d'ARN, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'environ 10 à 25 nucléotides capables de s'hybrider avec les 10 à 25 premiers nucléotides ou avec les 10 à 25 derniers nucléotides de ladite séquence de nucléotides codant pour un polypeptide de l'invention, dans les conditions d'hybridation définies ci-dessus.

Ainsi la présente invention concerne plus particulièrement un procédé de préparation d'un

polypeptide de l'invention comprenant les étapes suivantes ;

- le cas échéant, l'amplification préalable suivant la technique PCR de la quantité de séquences de nucléotides codant pour ledit polypeptide à l'aide de deux amorces d'ADN choisies de manière à ce que l'une de ces amorces soit identique aux 10 à 25 premiers nucléotides de la séquence nucléotidique codant pour ledit polypeptide, tandis que l'autre amorce est complémentaire des 10 à 25 derniers nucléotides (ou s'hybride avec ces 10 à 25 derniers nucléotides) de ladite séquence nucléotidique, ou inversement de manière à ce que l'une de ces amorces soit identique aux 10 à 25 derniers nucléotides de ladite séquence, tandis que l'autre amorce est complémentaire des 10 à 25 premiers nucléotides (ou s'hybride avec les 10 à 25 premiers nucléotides) de ladite séquence nucléotidique, suivie de l'introduction desdites séquences de nucléotides ainsi amplifiées dans un vecteur approprié,
- la mise en culture, dans un milieu de culture approprié, d'un hôte cellulaire préalablement transformé par un vecteur approprié contenant un acide nucléique selon l'invention comprenant la séquence nucléotidique codant pour ledit polypeptide, et
- la récupération, à partir du susdit milieu de culture du polypeptide produit par ledit hôte cellulaire transformé.

A titre d'exemple d'amorces d'ADN ou d'ARN selon l'invention, on citera les séquences suivantes:

3'→5' : TTTCGCTAGATCTTGTT et TCTAAATAGAAGAA

Les peptides selon l'invention peuvent également être préparés par les techniques classiques, dans le domaine de la synthèse des peptides. Cette synthèse peut être réalisée en solution homogène ou en phase solide.

Par exemple, on aura recours à la technique de synthèse en solution homogène décrit par HOUBENWEYL dans l'ouvrage intitulé "Methode der Organischen Chemie" (Méthode de la Chimie Organique) édité par E. Wunsch, vol. 15-I et II., THIEME, Stuttgart 1974.

Cette méthode de synthèse consiste à condenser successivement deux-à-deux les aminoacyles successifs dans l'ordre requis, ou à condenser des aminoacyles et des fragments préalablement formés et contenant déjà plusieurs aminoacyles dans l'ordre approprié, ou encore plusieurs fragments préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les fonctions réactives portées par ces aminoacyles ou fragments, à l'exception des fonctions amines de l'un et carboxyles de l'autre ou vice-versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction carboxyle, selon les méthodes bien connues dans la synthèse des peptides. En variante, on pourra avoir recours à des réactions de couplage mettant en jeu des réactifs de couplage classique, du type carbodiimide, tels que par exemple la 1-éthyl-3-(3-diméthyl-aminopropyl)-carbodiimide.

Lorsque l'aminoacyle mis en oeuvre possède une fonction acide supplémentaire (notamment dans le cas de l'acide glutamique), ces fonctions seront protégées, par exemple par des groupes t-butylester.

Dans le cas de la synthèse progressive, acide aminé par acide aminé, la synthèse débute de préférence par la condensation de l'acide-amino C-terminal avec l'acide-amino qui correspond à l'acide-amino voisin dans la séquence désirée et ainsi de suite, de proche en proche, jusqu'à l'acide aminé N-terminal.

Selon une autre technique préférée de l'invention, on a recours à celle décrite par R.D. MERRIFIELD dans l'article intitulé "Solid phase peptide synthesis" (J. Am. Chem. Soc., 45, 2149-2154).

Pour fabriquer une chaîne peptidique selon le procédé de MERRIFIELD, on a recours à une résine polymère très poreuse, sur laquelle on fixe le premier acide aminé C-terminal de la chaîne. Cet acide aminé est fixé sur la résine par l'intermédiaire de son groupe carboxylique et sa fonction amine est protégée, par exemple par le groupe t-butyloxycarbonyle.

Lorsque le premier acide aminé C-terminal est ainsi fixé sur la résine, on enlève le groupe protecteur de la fonction amine en lavant la résine avec un acide.

Dans le cas où le groupe protecteur de la fonction amine est le groupe t-butyloxycarbonyle, il peut être éliminé par traitement de la résine à l'aide d'acide trifluoroacétique.

On couple ensuite le deuxième acide aminé qui fournit le second acide-amino de la séquence recherchée, à partir du résidu acide-amino C-terminal sur la fonction amine déprotégée du premier acide aminé C-terminal fixé sur la chaîne. De préférence, la fonction carboxyle de ce deuxième acide aminé est

activée, par exemple par la dicyclohexylcarbodiimide, et la fonction amine est protégée, par exemple par le t-butyloxycarbonyle.

On obtient ainsi la première partie de la chaîne peptidique recherchée, qui comporte deux acide aminés, et dont la fonction amine terminale est protégée. Comme précédemment, on déprotège la fonction amine et on peut ensuite procéder à la fixation du troisième aminoacyle, dans les conditions analogues à celles de l'addition du deuxième acide aminé C-terminal.

On fixe ainsi, les uns après les autres, les acides aminés qui vont constituer la chaîne peptidique sur le groupe amine chaque fois déprotégé au préalable de la portion de la chaîne peptidique déjà formée, et qui est rattachée à la résine.

Lorsque la totalité de la chaîne peptidique désirée est formée, on élimine les groupes protecteurs des différents acide aminés constituant la chaîne peptidique et on détache le peptide de la résine par exemple à l'aide d'acide fluorhydrique.

L'invention concerne également les oligomères hydrosolubles des peptides monomères sus-indiqués.

L'oligomérisation peut provoquer un accroissement de l'immunogénicité des peptides monomères selon l'invention. Sans qu'une telle indication chiffrée puisse être considérée comme limitative, on mentionnera néanmoins que ces oligomères peuvent, par exemple, contenir de 2 à 10 unités monomères.

On peut avoir recours, pour réaliser l'oligomérisation, à toute technique de polymérisation couramment utilisée dans le domaine des peptides, cette polymérisation étant conduite

jusqu'à l'obtention d'un oligomère ou polymère contenant le nombre de motifs monomères requis pour l'acquisition de l'immunogénicité désirée.

Une méthode d'oligomérisation ou de polymérisation du monomère consiste dans la réaction de celui-ci avec un agent de réticulation tel que le glutaraldéhyde.

On peut également avoir recours à d'autres méthodes d'oligomérisation ou de couplage, par exemple à celle mettant en jeu des couplages successifs d'unités monomères, par l'intermédiaire de leurs fonctions terminales carboxyle et amine en présence d'agents de couplage homo- ou hétéro-bifonctionnels.

L'invention concerne encore les conjugués obtenus par couplage covalent des peptides selon l'invention (ou des susdits oligomères) à des molécules porteuses (naturelles ou synthétiques), physiologiquement acceptables et non toxiques, par l'intermédiaire de groupements réactifs complémentaires respectivement portés par la molécule porteuse et le peptide. Des exemples de groupements appropriés sont illustrés dans ce qui suit :

A titre d'exemple de molécules porteuses ou supports macromoléculaires entrant dans la constitution des conjugués selon l'invention, on mentionnera des protéines naturelles, telles que l'anatoxine tétanique, l'ovalbulmine, des sérums albumines, des hémocyamines, le PPD de la tuberculine (PPD : "Purified Protein Derivative"), etc...

A titre de supports macromoléculaires synthétiques, on mentionnera par exemple des polylysines ou des poly(D-L-alanine)-poly(L-lysine).

^{smr} La littérature mentionne d'autres types de supports macromoléculaires susceptibles d'être utilisés, lesquels présentent en général un poids moléculaire supérieur à 20 000.

Pour synthétiser les conjugués selon l'invention, on peut avoir recours à des procédés connus en soi, tels que celui décrit par FRANTZ et ROBERTSON dans *Infect. and Immunity*, 33, 193-198 (1981), ou celui décrit dans *Applied and Environmental Microbiology*, (octobre 1981), vol. 42, n° 4, 611-614 par P.E. KAUFFMAN en utilisant le peptide et la molécule porteuse appropriée.

Dans la pratique, on utilisera avantageusement comme agent de couplage les composés suivants, cités à titre non limitatif : aldéhyde glutarique, chloroformiate d'éthyle, carbodiimides hydrosolubles [N'(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide, HCl], diisocyanates, bis-diazobenzidine, di- et trichloro-s-triazines, bromures de cyanogène, ainsi que les agents de couplage mentionnés dans *Scand. J. Immunol.*, (1978), vol. 8, p. 7-23 (AVRAMEAS, TERNYNCK, GUESDON).

On peut avoir recours à tout procédé de couplage faisant intervenir d'une part une ou plusieurs fonctions réactives du peptide et d'autre part, une ou plusieurs fonctions réactives de molécules supports. Avantageusement, il s'agit des fonctions carboxyle et amine, lesquelles peuvent donner lieu à une réaction de couplage en présence d'un agent de couplage du genre de ceux utilisés dans la synthèse des protéines, par exemple, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiximide, le N-hydroxy-benzotriazole, etc... On peut encore avoir recours à la glutaraldéhyde, notamment lorsqu'il s'agit de

relier entre eux des groupes aminés respectivement portés par le peptide et la molécule support.

Les acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés soit par un procédé chimique, soit par d'autres procédés.

Un mode de préparation approprié des acides nucléiques comportant au maximum 200 nucléotides (ou 200 pb, lorsqu'il s'agit d'acides nucléiques bicaténaires) de l'invention comprend les étapes suivantes :

- la synthèse d'ADN en utilisant la méthode automatisée des β -cyanethylphosphoramidite décrite dans Bioorganic Chemistry 4; 274-325 (1986),
- le clonage des acides nucléiques ainsi obtenus dans un vecteur approprié et la récupération de l'acide nucléique par hybridation avec une sonde appropriée.

Un mode de préparation, par voie chimique, d'acides nucléiques de longueur supérieure à 200 nucléotides (ou 200pb, lorsqu'il s'agit d'acides nucléiques bicaténaires) de l'invention comprend les étapes suivantes :

- l'assemblage d'oligonucléotides synthétisés chimiquement, pourvus à leurs extrémités de sites de restriction différents, dont les séquences sont compatibles avec l'enchaînement en acides aminés du polypeptide naturel selon le principe décrit dans Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80; 7461-7465, (1983),
- le clonage des acides nucléiques ainsi obtenus dans un vecteur approprié et la récupération de l'acide nucléique recherché par hybridation avec une sonde appropriée.

Les acides nucléiques de l'invention peuvent également être préparés de la manière suivante :

- incubation de l'ADN génomique, isolé à partir d'une souche de P. falciparum, avec de l'ADNase I, puis addition d'EDTA et purification par extraction au mélange phenol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) puis par l'éther,
- traitement de l'ADN ainsi extrait par de l'Eco R1 méthylase en présence de DTT, et purification par extraction telle que décrite ci-dessus,
- incubation de l'ADN ainsi purifié avec les 4 désoxynucléotides triphosphates dATP, dCTP, dGTP, et dTTP en présence de T4 ADN polymérase et d'ADN ligase de E. coli, puis purification selon la méthode décrite ci-dessus,
- le clonage des acides nucléiques ainsi obtenus dans un vecteur approprié et la récupération de l'acide nucléique recherché à l'aide d'une sonde appropriée.

Les sondes nucléotidiques utilisées pour la récupération de l'acide nucléique recherché dans les procédés sus-mentionnés, sont constituées généralement de 40 à 200 nucléotides de la séquence nucléotidique représentée sur la figure 2 (plus particulièrement choisis parmi ceux situés entre les positions 597 à 949 de la figure 2) ou sur la figure 4, ou sa séquence complémentaire, et sont susceptibles de s'hybrider avec l'acide nucléique recherché dans les conditions d'hybridation définies ci-dessus. La synthèse de ces sondes est effectuée selon la méthode automatisée des β -cyanethylphosphoramidite décrite dans Bioorganic Chemistry 4, 274-325 (1986).

Les molécules selon l'invention possèdent des propriétés antigéniques caractéristiques des antigènes porteurs d'épitopes T, et le cas échéant B, et qui sont soit spécifiques du stade hépatique du

développement de P.falciparum, soit spécifiques des stades sporozoïte, hépatique et sanguin à la fois.

En effet, comme il le sera plus particulièrement décrit à l'aide d'exemples de molécules selon l'invention dans la description détaillée qui suit, les molécules selon l'invention comportant tout ou partie de l'enchaînement des acides aminés compris entre les positions 200 et 316 de la figure 1, réagissent spécifiquement avec les anticorps ou les lymphocytes dirigés contre les épitopes B et/ou T des antigènes produits au stade hépatique de P. falciparum, mais pas avec les anticorps dirigés contre d'autres antigènes produits par P. falciparum ou contre des antigènes produits par d'autres espèces de Plasmodium.

Ces molécules selon l'invention reconnaissent donc spécifiquement les anticorps produits par le système immunitaire d'un individu infecté par P. falciparum sous l'effet des antigènes LS dont le caractère fortement immunogène a été précédemment mentionné.

Les molécules selon l'invention comprenant tout ou partie de l'enchaînement peptidique de la figure 3 ne sont pas reconnus par les anticorps précédents réagissant spécifiquement avec tout ou partie du polypeptide délimité par les acides aminés situés aux positions 200 à 316 de la figure 1.

Par contre les polypeptides correspondant à tout ou partie de l'enchaînement peptidique de la figure 3 sont reconnus par des anticorps réagissant spécifiquement avec des antigènes localisés à la surface de sporozoïtes (provenant de souches différentes de P. falciparum), ainsi qu'avec des antigènes des schizontes hépatiques et des schizontes

sanguins, et enfin avec la surface des sporozoïtes de P. yoelii mais pas de P. Berghei.

Il faut souligner également que les anticorps reconnaissant spécifiquement les polypeptides correspondant à tout ou partie de l'enchaînement peptidique de la figure 3 sont capables de bloquer à 100 % l'entrée des sporozoïtes de P. yoelii dans des cellules hépatiques de rongeurs in vitro, à la différence des anticorps dirigés contre la protéine circumsporozoïtaire de P. yoelii, comme de P. falciparum.

La possibilité de production en grande quantité des molécules selon l'invention ainsi que leurs propriétés de reconnaissance spécifique d'anticorps parmi les plus activement produits lors de l'infection d'un individu par P. falciparum, font desdites molécules des réactifs de choix pour le diagnostic in vitro du paludisme chez un individu infecté par P. falciparum.

L'invention concerne donc un procédé de détection in vitro d'anticorps corrélables au paludisme issu de l'infection d'un individu par P. falciparum dans un tissu ou fluide biologique susceptible de les contenir, ce procédé comprenant la mise en contact de ce tissu ou fluide biologique avec une molécule selon l'invention dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre lesdites molécules et les anticorps éventuellement présents dans le tissu ou fluide biologique, et la détection in vitro des complexes antigènes-anticorps éventuellement formés.

De préférence, le milieu biologique est constitué par un sérum humain.

Toute procédure classique peut être mise en oeuvre pour réaliser une telle détection.

A titre d'exemple une méthode préférée met en jeu des processus immunoenzymatiques selon la technique ELISA, ou immunofluorescents, ou radioimmunologiques (RIA) ou équivalent.

Ainsi l'invention concerne également toute molécule décrite ci-dessus marquée à l'aide d'un marqueur adéquat du type enzymatique, fluorescent, radioactif, etc...

De telles méthodes comprennent par exemple les étapes suivantes :

- dépôt de quantités déterminées d'une composition polypeptidique selon l'invention dans les puits d'une microplaque de titration,
- introduction dans lesdits puits de dilutions croissantes du sérum devant être diagnostiqué,
- incubation de la microplaque,
- rinçages répétés de la microplaque,
- introduction dans les puits de la microplaque d'anticorps marqués contre des immunoglobulines du sang, le marquage de ces anticorps ayant été réalisé à l'aide d'une enzyme sélectionnée parmi celles qui sont capables d'hydrolyser un substrat en modifiant l'absorption des radiations de ce dernier, au moins à une longueur d'onde déterminée,
- détection, en comparaison avec un témoin de contrôle, de la quantité de substrat hydrolysé.

L'invention concerne également des coffrets ou kits pour le diagnostic in vitro du paludisme provoqué par P. falciparum qui comprennent :

- une composition polypeptidique selon l'invention,
- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,

- les réactifs permettant la détection des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où la composition polypeptidique sus-mentionnée n'est pas marquée, - un tissu ou fluide biologique de référence dépourvu d'anticorps reconnus par la composition polypeptidique sus-mentionnée.

L'invention concerne les anticorps eux-mêmes formés contre les polypeptides de l'invention.

Il va de soi que cette production n'est pas limitée aux anticorps polyclonaux.

Elle s'applique encore à tout anticorps monoclonal produit par tout hybridome susceptible d'être formé, par des méthodes classiques, à partir des cellules spléniques d'un animal, notamment de souris ou de rat, immunisés contre l'un des polypeptides purifiés de l'invention, d'une part et des cellules d'une lignée de cellules d'un myélome approprié d'autre part, et d'être sélectionné, par sa capacité à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant le polypeptide initialement mis en oeuvre pour l'immunisation des animaux.

L'invention concerne également une sonde nucléotidique de détection caractérisée en ce qu'elle est constituée par tout ou partie d'une des séquences de nucléotides telles que définies ci-dessus de l'invention.

L'invention a plus particulièrement pour objet une méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par P.falciparum qui comprend les étapes suivantes :

- éventuellement l'amplification préalable de la quantité de séquences de nucléotides selon l'invention, susceptibles d'être contenues dans l'échantillon biologique prélevé chez ledit individu, à l'aide de deux amorces d'ADN choisies de la manière indiquée ci-dessus,
- la mise en contact de l'échantillon biologique sus-mentionné avec une sonde nucléotidique telle que définie ci-dessus, dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre ladite sonde et ladite séquence de nucléotides,
- la détection du complexe d'hybridation sus-mentionné éventuellement formé.

A titre d'exemple de sondes nucléotidiques de l'invention, on citera les séquences suivantes :

3'->5' : TTTCGCTAGATCTTGTT et TCTAAATAGAAGAAA

L'invention ouvre surtout la voie à la mise au point de nouveaux principes vaccinaux contre le paludisme issu de l'infection d'un individu par P. falciparum.

L'invention concerne également les compositions préparées sous forme de vaccins contenant soit un ou plusieurs peptides selon l'invention, soit un oligomère de ce ou ces peptides, soit encore un conjugué de ce ou ces peptides ou oligomère avec une molécule porteuse, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable approprié et, le cas échéant, avec d'autres principes actifs vaccinaux contre le paludisme.

Une composition pharmaceutique particulièrement avantageuse, de l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de l'enchaînement peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 200 à 316 de la figure 1, en association

avec tout ou partie de la séquence peptidique représentée sur la figure 3.

Des compositions pharmaceutiques avantageuses sont constituées par des solutions, suspensions ou liposomes injectables contenant une dose efficace d'au moins un produit selon l'invention. De préférence, ces solutions, suspensions ou liposomes sont réalisés dans une phase aqueuse stérilisée isotonique, de préférence saline ou glucosée.

L'invention concerne plus particulièrement de telles suspensions, solutions ou forme liposome qui sont aptes à être administrées par injections intradermiques, intramusculaires ou sous-cutanées, ou encore par scarifications.

Elle concerne également des compositions pharmaceutiques administrables par d'autres voies, notamment par voie orale ou rectale, ou encore sous forme d'aérosols destinés à venir en contact avec des muqueuses, notamment les muqueuses oculaires, nasales, pulmonaires ou vaginales.

En conséquence, elle concerne des compositions pharmaceutiques dans lesquelles l'un au moins des produits selon l'invention se trouve associé à des excipients pharmaceutiquement acceptables, solides ou liquides, adaptés à la constitution de formes orales, oculaires ou nasales, ou avec des excipients adaptés à la constitution des formes d'administration rectale, ou encore avec des excipients gélatineux pour l'administration vaginale. Elle concerne aussi des compositions liquides isotoniques contenant l'un au moins des conjugués selon l'invention, adaptées à l'administration sur les muqueuses, notamment oculaires ou nasales.

Avantageusement, les compositions vaccinales selon l'invention contiennent en outre un véhicule, tel que la polyvinyl-pyrrolidone, facilitant l'administration du vaccin. A la place de la polyvinyl-pyrrolidone, on peut utiliser tout autre type d'adjuvant au sens classique que l'on donnait autrefois à cette expression, c'est-à-dire d'une substance permettant l'absorption plus aisée d'un médicament ou facilitant son action dans l'organisme. A titre d'exemples d'autres adjuvants de ce dernier type, on mentionnera encore la carboxyméthyl-cellulose, les hydroxydes et phosphates d'aluminium, la saponine, ou tous autres adjuvants de ce type, bien connus de l'homme de l'art. Enfin elles contiennent si besoin un adjuvant immunologique, notamment du type muramylpeptide.

L'invention concerne aussi des compositions pharmaceutiques contenant à titre de substance active l'un au moins des anticorps polyclonaux ou monoclonaux définis précédemment en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention ne se limite évidemment pas aux modes de réalisation décrits ci-dessus à titre d'exemples et l'homme de l'art peut y apporter des modifications sans pour autant sortir du cadre des revendications ci-après ; notamment certains des acides aminés intervenant dans la séquence des peptides selon l'invention peuvent être remplacés par des acides aminés isofonctionnels ou isostériques ; par exemple, une ou plusieurs des substitutions suivantes peuvent être envisagées :

- Glu est substitué par Asp ou Gln,
- Leu est remplacé par Ala, etc...

Il est naturellement bien entendu que les peptides qui résultent de telles substitutions consistent en des équivalents des peptides plus particulièrement revendiqués, dès lors qu'eux-mêmes ou des oligomères ou conjugués formés à partir de ces peptides présentent des propriétés immunogènes semblables.

L'invention concerne également encore plus particulièrement les "protéines chimères" qui peuvent être obtenues par les techniques du génie génétique, ces protéines chimères pouvant contenir une ou plusieurs des séquences peptidiques de l'invention, et incorporées ou rattachées à un fragment peptidique autre que la β -galactosidase. Ce dernier fragment peptidique a de préférence un poids moléculaire suffisant pour renforcer l'immunogénicité des séquences peptidiques selon l'invention et n'interfère pas du point de vue immunologique avec la manifestation de l'immunogénicité recherchée.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit des conditions dans lesquelles les polypeptides de l'invention ont été obtenus.

Des sérums provenant d'individus européens vivant dans des zones endémiques et suivant une prophylaxie continue avec des médicaments dirigés contre les schizontes des stades sanguins (chloroquine) ont été sélectionnés et testés en utilisant des antigènes du stade sporozoïte, du stade hépatique (antigènes LS), et des stades sanguins. La plupart de ces sérums réagissent avec les antigènes de tous les stades probablement car la prophylaxie a été interrompue. Trois sérums prélevés à partir d'individus ayant résidé en Afrique tropicale rurale

et ayant ingéré 100 mg de chloroquine par jour sans interruption pendant 23 à 26 ans, ne réagissent pas avec les antigènes des stades sanguins suivant le test d'immunofluorescence (IFA). Ces trois sérums possèdent toutefois des titres élevés en anticorps dirigés contre les sporozoïtes et les protéines LS (dilution IFA 1/3200 et 1/6400 respectivement).

Un des trois sérums précédents, de spécificité réduite, a été utilisé pour cribler une banque d'ADN génomique construite dans le bactériophage λ gt 11 de la manière suivante :

1) CONSTRUCTION DE LA BANQUE D'ADN GENOMIQUE DE Plasmodium falciparum.

L'ADN génomique du clone 96 de la souche thaïlandaise Tak9 de P.falciparum (Science, 212, 1.37-1.38 (1981) a été isolé par les techniques classiques.

Des échantillons de 18 μ g d'ADN de P.falciparum ont été incubés à 15°C dans un tampon 50 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM $MnCl_2$, 20 μ g/ml de sérum albumine bovine, avec des quantités respectives d'ADNase I (Boehringer Mannheim) de 5 pg pendant 5 minutes ou bien de 3.5 pg pendant 5 ou 10 minutes. Après addition de 5 mM EDTA (Ethylènediamine tetracétique acide), les échantillons d'ADN sont réunis et purifiés par extraction au mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 V/24 V/1 V) puis par l'éther. L'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol à -20°C en présence de 2.5 M d'acétate d'ammonium.

45 μ g d'ADN ainsi traité ont été méthylés par 180 U d'Eco R1 méthylase (Biolabs) dans les conditions recommandées par le fournisseur, avec l'addition supplémentaire de 5 mM DTT

(dithiothreitol), pendant 15 minutes à 37°C. Après purification de l'ADN comme ci-dessus, 10 µg d'ADN ont été incubés avec 40 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM sulfate d'ammonium, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA, 0.05 mM NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) 0.1 mM dXTP (comprenant les 4 desoxynucleotides triphosphates dATP, dCTP, dGTP et dTTP), en présence de 10 U T4 ADN polymérase (PL Biochemicals) et de 10 U de E. coli ADN ligase (Biolabs). L'ADN a été purifié et concentré comme ci-dessus.

8 µg d'ADN ont alors été ligaturés avec 0.4 µg d'un adaptateur ou "linker" Eco R1 (adaptateurs phosphorylés Eco R1 commercialisés par Biolabs) par 4 U T4 ADN ligase (Biotec) dans le tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml sérum albumine bovine.

Après incubation à 4°C pendant 5 heures, on ajoute 2 U T4 ADN ligase et la réaction est poursuivie à 4°C pendant 16 heures. Le tube est soumis à plusieurs cycles de congélation à -80°C/décongélation pour arrêter la réaction. L'ADN est ensuite dilué et le tampon d'incubation ajusté de façon à obtenir les conditions recommandées par le fournisseur pour l'utilisation de l'enzyme Eco R1. 100 U d'enzyme Eco R1 (Promega Biotec) sont ajoutées et incubées pendant 3 heures à 37°C. La réaction est arrêtée par un chauffage de 10 minutes à 60°C, et l'ADN est purifié et concentré comme ci-dessus.

L'ADN est resuspendu dans 100 µl de tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, et déposé sur un gradient 5-20 % de saccharose préparé en 25 mM acétate de sodium, 10 mM EDTA et centrifugé dans le rotor

Beckman SW 50.1 à 45,000 tours par minute pendant 150 minutes.

Les fractions sont analysées sur gel d'agarose et celles qui contiennent les fragments d'ADN de tailles comprises entre environ 300 pb. et 2 500 pb. sont rassemblées, dialysées contre le tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA à 4°C. L'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol. Environ 400 ng de cet ADN ont été ligaturés à 1 µg d'ADN du vecteur λgt11 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 1194-1198 (1983)) coupé par Eco R1 et déphosphorylé (Protoclone de Promega Biotec), dans un volume de 10 µl, (en tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml sérum albumine bovine) par 1 U T4 ADN ligase (Biotec).

Les produits de ligature ont été encapsidés in vitro dans les extraits d'E. coli préparés à partir des souches bactériennes construites par B. Hohn (Methods Enzymol. 68, 299), selon la technique décrite par Maniatis et coll. (Molecular cloning, a laboratory manual, p. 264, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)).

Environ 7 millions de bactériophages recombinants ont été obtenus.

2) CRIBLAGE IMMUNOLOGIQUE DE LA BANQUE

Les bactériophages recombinants ont été étalés sur un milieu de culture contenant la bactérie indicatrice Y 1090, à une densité de 50,000 plages par boîte de Pétri de 90 mm, et incubés à 42°C pendant 3 heures.

Un filtre de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, BA 85) saturé par 0,01 M IPTG isopropyl-b-thiogalactopyranoside (Sigma) est déposé sur les boîtes, qui sont incubées à 37°C pendant 3 heures. Au

terme de ces incubations, les filtres de nitrocellulose sont prélevés, et les boîtes de Pétri conservées à 4°C.

Les filtres de nitrocellulose sont placés dans un bain de tampon TL : 50 mM tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 % lait écrémé, 0.05 % Tween 20 (Sigma). Les filtres sont incubés 15 heures à 4°C en tampon TL, puis 2 fois 15 minutes à 20°C. Ils sont alors incubés pendant une heure avec un pool d'antisérums humains immuns dirigés contre les antigènes de tous les stades de développement de P. falciparum, traité au préalable pour le dépler en anticorps anti-E.coli selon la technique décrite par Ozaki et coll. (J. Immunol. Methods, 89, 213-219, 1986). Le pool d'antisérums humains a été utilisé à la dilution 1/200, en tampon TL. L'incubation a été faite à 20°C pendant 1 heure. Les filtres ont été lavés 4 fois avec le tampon TL, puis incubés avec des anticorps anti-immunoglobulines humaines conjugués à la peroxydase de raifort (Biosys) et iodisés à l'iode ¹²⁵I, pendant 1 heure à 20°C. Après plusieurs lavages en tampon TL, puis en tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, l'activité enzymatique de la peroxydase est révélée (Ozaki et coll, précédemment cité), les filtres sont séchés à l'air libre et autoradiographiés sur film Kodak Royal X-OMat AR, avec un écran amplificateur.

Une collection d'environ 1 200 clones de bactériophages recombinants a été constituée en prélevant les plages de lyse correspondant aux signaux positifs. Ces clones ont été ensuite soumis à un second cycle de criblage immunologique, en employant cette fois un des trois sérums humains précédemment décrits et présentant pas ou peu

d'anticorps dirigés contre les formes érythrocytaires de P. falciparum et un titre élevé contre les formes sporozoïte et hépatique du parasite (formes pré-érythrocytaires). Ce criblage immunologique a été effectué selon le protocole décrit ci-dessus. Ce sérum a conduit à identifier environ 120 clones recombinants parmi 1200 testés.

Les anticorps humains qui réagissent avec les déterminants antigéniques exprimés par les clones recombinants ont été purifiés par affinité sur les protéines recombinantes, selon la technique décrite par Ozaki et coll. (précédemment cité). Ces anticorps spécifiques ont été incubés avec des préparations de parasites à différents stades de développement (sporozoïte, stade hépatique ou stades érythrocytaires), et la réaction a été étudiée par immunofluorescence indirecte.

Les clones recombinants sur lesquels sont retenus par affinité des anticorps spécifiques du stade hépatique, et donc qui expriment des déterminants propres à ce stade ont été étudiés : il s'agit des clones DG 307, DG 199 et DG 145. Ces anticorps spécifiques de ces trois clones réagissent spécifiquement avec les schizontes hépatiques, tels que l'on peut les obtenir après infection d'hépatocytes humains ou de singes par des sporozoïtes de P.falciparum ; la localisation de la fluorescence a été déterminée comme étant identique à celle considérée caractéristique de LSA.

La spécificité d'espèce et de stade des 3 clones DG 145, DG 199, et DG 307 a été testée de la manière suivante. Premièrement, il a été déterminé que les mêmes anticorps purifiés par affinité et qui réagissent par IFA (ou encore qui sont IFA positifs)

avec LSA, ne réagissent pas avec des préparations de sporozoïtes sèches ou humides, ni avec les antigènes des stades sanguins, qu'ils soient testés par IFA avec des parasites fixés à l'acétone, ou par immunotransfert (immunoblotting) en utilisant des protéines de tous les stades extraites au SDS. Les anticorps purifiés par affinité ne réagissent pas avec les antigènes de stade hépatique de P. yoelii, ni avec les schizontes hépatiques de P. vivax préparés à partir de singes Saimiri sciureus.

Deuxièmement, les protéines recombinantes de DG 145, DG 199 et DG 307 ne réagissent pas avec les sérums provenant de deux patients atteints de malaria (paludisme causé par P. falciparum) par transfusion accidentelle et qui, par définition n'ont donc pas d'anticorps contre les antigènes spécifiques des stades précédents (sporozoïtes et antigènes du stade hépatique). Ces protéines ne réagissent pas avec deux anticorps monoclonaux reconnaissant le tétrapeptide CS, avec les sérums de souris immunisées avec les antigènes CS recombinants R32t et 32 (Science, 228, 958 (1985)). De plus, les protéines recombinantes n'ont pas réagi avec des antisérums humains dirigés contre P. vivax (bien que les sérums furent positifs avec les schizontes hépatiques de P. vivax), P. ovale et P. cynomolgi (Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 60, 348 (1980)) quand elles sont testées par la technique de taches d'immunotransfert (immunodot blots), alors qu'elles sont positives avec tous les sérums humains anti-P. falciparum testés.

Au sein de cette sous-population de 120 clones sus-mentionnée, une technique de criblage immunologique par des anticorps purifiés par affinité sur le clone DG307 (ou 145, ou 199) conduit à la

détection de 40 clones environ sur 120 présentant apparemment l'épitope caractéristique du LSA et défini par la structure de base de 17 acides aminés citée plus haut.

De même des techniques d'identification par hybridation à l'aide de fragments d'ADN des mêmes clones (DG307) permettent d'identifier ces structures répétées dans les mêmes clones que ceux identifiés par les tests immunologiques.

Un criblage complémentaire du sous-ensemble de 40 clones appartenant à cette famille de l'antigène LSA a été utilisé pour identifier d'autres parties du gène comportant des séquences distinctes de celles définies par les répétitions de 17 acides aminés. Pour ce criblage complémentaire, des sérums identifiés comme ne réagissant pas avec les répétitions des 17 acides aminés, mais positifs en immunofluorescence indirecte avec la structure périphérique du schizonte hépatique où est situé l'antigène LSA, ont été employés. Au sein de la famille des 40 clones du LSA, ces sérums ont été trouvés positifs pour plusieurs d'entre eux, et l'un des clones comportant le plus grand insert, dénommé DG536, a été sélectionné et étudié en détail.

L'insert de 951 paires bases a été purifié et recloné dans le bactériophage M13 mp19. La séquence d'ADN et l'organisation génomique du gène LSA ont alors été déterminées. La figure 1 montre que le clone comporte à l'extrémité 5' une séquence de 209 acides aminés correspondant à une série des 12 répétitions de 17 acides aminés, similaires à celles décrites dans l'article de Guérin-Marchand et coll. (Nature, sus-mentionné) et comporte ensuite une série

de 106 acides aminés dont la structure est non répétitive.

Ainsi qu'on le voit dans la figure 1, le motif de 17 acides aminés est dans deux répétitions (cf. motif correspondant aux positions 35 à 51, et celui correspondant aux positions 137 à 153 de la figure 1) identique à celui décrit dans l'article de Guérin-Marchand et coll. et les autres répétitions présentent une substitution d'une leucine par une arginine (cf. positions 8, 59, 76, 110, 127, 161, 178 et 195 de la figure 1), une substitution d'un acide glutamique par un acide aspartique (cf. positions 23 et 91 de la figure 1), ainsi qu'une substitution d'une sérine par une arginine (cf. position 205 de la figure 1).

La taille de la protéine native du LSA dans le parasite a pu être mesurée au prix de grandes difficultés. Des schizontes hépatiques de P. falciparum ont été produits in vitro par infection d'hépatocytes humains de primo culture avec des glandes salivaires de moustiques contenant des sporozoïtes selon la technique décrite dans Mazier et coll. (Science n°227, p440, 1985). Après 7 jours de culture, les cellules infectées sont recueillies et utilisées pour préparer un extrait analysé en gel de polyacrylamide contenant du SDS et transféré sur nitrocellulose. Les antigènes hépatiques sont ensuite révélés par un anticorps purifié par affinité sur les répétitions de 17 acides aminés déjà cités du LSA. Ces anticorps marquent une protéine de poids moléculaire de 200 000 Daltons.

L'hybridation du clone DG307 avec les fragments d'ADN de P. falciparum obtenus par digestion avec une enzyme de restriction, la Mung Bean nucléase, selon

les conditions décrites par McCutchans (NAR, 16, 14, 6883-6896, 1988), capable de couper chaque extrémité des gènes du parasite, révèle une bande unique d'un poids moléculaire de 5 Kbases cohérent avec la taille de la protéine native mesurée dans l'extrait parasitaire.

En microscopie électronique des schizontes hépatiques obtenus par injection de sporozoites de chimpanzés, le marquage des anticorps anti-LSA purifiés par affinité, visualisés par un deuxième anticorps marqué à l'or colloïdal, révèle que la molécule LSA est distribuée : a) au stade du trophozoite hépatique et du schizonte jeune, dans des vacuoles contenant des granules qui s'ouvrent et se déversent dans la vacuole parasitophore, b) au stade du schizonte sub-mature âgé de 5 jours, en périphérie du schizonte hépatique dans les granules présents dans la vacuole parasitophore du parasite, c) chez les schizontes mûrs âgés de 6 jours à 7 jours, dans la vacuole parasitophore ainsi qu'entre les pseudo-cytomères du schizonte, puis finalement autour des mérozoïtes en formation.

L'étude de la réponse immunologique de sujets exposés au paludisme ainsi que d'animaux immunisés avec les protéines recombinantes et/ou synthétiques, permet de préciser la fonction biologique de la protéine LSA et de certains segments de cette protéine en particulier ceux contenus dans les peptides synthétiques.

L'immunisation de souris par les protéines LSA-R-NR et l'étude de la réponse des lymphocytes de ces souris, ainsi que l'immunisation de souris de différents haplotypes par les peptides LSA-R, LSA-J et LSA-NR et enfin l'étude des réponses des

lymphocytes des sujets exposés au paludisme vis-à-vis des peptides LSA-R, indiquent qu'aucun épitope T pour l'homme et la souris n'est défini par la partie répétée de la molécule LSA. Par contre, ainsi qu'il avait été indiqué précédemment, ces régions constituent un excellent épitope B pour l'homme ou la souris, défini par la partie répétée de la molécule LSA, et les résultats complémentaires obtenus depuis chez plus de 500 individus exposés au paludisme indiquent que cet épitope est reconnu par les anticorps de près de 95 % des sujets étudiés, au Sénégal, en Haute Volta, à Madagascar et au Kenya.

L'étude préliminaire des lymphocytes de 5 sujets africains adultes exposés au paludisme, ainsi que des lymphocytes de chimpanzés (*Pan troglodytes*) immunisés par la protéine recombinante LSA-R-NR (clone DG536), révèle qu'un épitope T de la molécule LSA est défini par la séquence d'acides aminés contenue dans le peptide synthétique LSA-NR. Un autre épitope T est contenu dans les séquences du peptide synthétique LSA-J. Des réponses prolifératives des lymphocytes humains et des lymphocytes de chimpanzé immunisé ont été observées après stimulation par ces deux peptides, a) chez le chimpanzé les lignées lymphocytaires obtenues sont à 60 % du phénotype CD8+, b) chez la souris, l'injection de l'un ou l'autre de ces peptides permet de "primer" immunologiquement le système immunitaire de la souris et d'obtenir la production à taux élevé d'anticorps contre l'épitope B du peptide LSA-R après l'injection de la protéine recombinante LSA-R-NR. L'identification de ces épitopes capables de stimuler les lymphocytes T a une grande importance dans la mesure où il a été établi dans le paludisme des

rongeurs que la protection induite par des sporozoïtes irradiés repose sur la production de lymphocytes cytotoxiques pour l'hépatocyte infecté, et capable de les détruire.

En outre, l'étude de 230 sérums de sujets africains indique aussi que le peptide LSA-NR définit un épitope B, distinct de celui que l'on trouve dans les répétitions, reconnu par environ 65 % des sujets étudiés.

L'intérêt potentiel des épitopes T du LSA, en particulier, ceux contenus dans la partie non répétée, est en outre fortement renforcé par les résultats obtenus chez le chimpanzé:

chez le chimpanzé ayant été immunisé par 3 injections à 15 jours d'intervalle d'un mélange de deux protéines recombinantes adsorbées sur alun, d'une part la protéine recombinante LSA-R-NR (clone DG536), et d'autre part la protéine recombinante dénommée DG729S (clone DG729S faisant partie des 120 clones sus-mentionnés), plusieurs résultats importants ont pu être obtenus:

- une production d'anticorps spécifiques de chacune des deux molécules recombinantes, c'est-à-dire réagissant avec la protéine LSA-R-NR et les peptides synthétiques, ainsi qu'avec la protéine recombinante 729S, a été détectée.

- une réponse proliférative spécifique des lymphocytes a été obtenue vis-à-vis du peptide LSA-NR, et également du peptide LSA-J. Les lymphocytes proliférant sont pour 60 % d'entre eux de phénotype CD8+, qui correspond en particulier à des cellules T cytotoxiques.

- Après immunisation des chimpanzés, une épreuve d'infection par injection intraveineuse de 28

millions de sporozoites de P. falciparum a été réalisée chez un chimpanzé immunisé et chez un chimpanzé témoin (ayant reçu une protéine témoin recombinante non apparentée), et des biopsies hépatiques ont été réalisées au 6ème jour après infection. L'examen des biopsies montre l'existence d'une réaction cellulaire, lympho-monocytaire, autour des schizontes hépatiques, infiltrant ces schizontes, et capables de les détruire. De telles images n'ont pas été observées chez le chimpanzé ayant reçu l'antigène contrôle.

Cette réaction cellulaire témoigne de l'existence d'épitopes T dans les molécules injectées 729 S et LSA-R-NR (DG 536), capables d'être exprimés dans les molécules injectées, capables d'être exprimés par les schizontes hépatiques, et d'induire un afflux cellulaire ; ce résultat est en accord avec les résultats des tests de prolifération lymphocytaires ; enfin il indique que la réponse immunitaire induite par les protéines recombinantes injectées est capable lors de la pénétration du parasite d'induire un afflux cellulaire, lui-même capable de concourir à la défense de l'organisme, en détruisant les parasites en position intra-hépatocytaire.

Les spécificités antigéniques et/ou immunologiques des polypeptides de l'invention sont les suivantes :

- le polypeptide 536 :

* est reconnu :

- . par des anticorps provenant de sujets ayant le paludisme,
- . par des sérums de chimpanzés immunisés avec la protéine 536 complète recombinante,

- * co-réagit avec les polypeptides décrits dans Guérin-Marchand et al (Nature sus-mentionné) par l'intermédiaire des séquences répétitives,
- * induit la formation d'anticorps (présence d'épitopes B),
- * induit des réponses prolifératives de lymphocytes T (présence d'épitope T) chez le chimpanzé et chez l'homme.

- le polypeptide NR comprend un épitope T important et un épitope B pour l'homme comme pour l'animal immunisé (souris et chimpanzé)

- le polypeptide LSA-J comprend un épitope B distinct de celui de la répétition de 17 acides aminés probablement en raison de la substitution de S par R, et comprend un épitope T reconnu chez l'homme et le chimpanzé.

La protéine recombinante 729 S :

- est reconnue :

* par des anticorps de sujets exposés au paludisme,

* par des sérum de chimpanzés, et de souris, immunisés par la protéine 729 S,

- est mieux reconnue par les individus capables de résister à l'impaludation que par ceux qui n'y résistent pas (au nord du Sénégal, les inventeurs ont administré une cure radicale de chloroquine à 100 individus, et suivi pendant la période de transmission, de septembre à décembre, la re-positivation du sang a) chez des sujets qui se sont positifs, aucun anticorps contre la protéine 729 S n'a été détecté b) chez plus de la moitié de ceux qui ne se sont pas re-positifs, il existait une réponse à taux élevés contre la protéine 729 S).

Il apparaîtra immédiatement à l'homme de métier que dans les séquences nucléiques sus-mentionnées, certains des nucléotides peuvent être remplacés par d'autres en raison de la dégénérescence du code génétique sans que pour autant les peptides codés ne soient modifiés. Toutes ces séquences nucléotidiques, ainsi que celles qui codent pour des polypeptides qui diffèrent des précédents par un ou plusieurs acides aminés sans que leur activité immunogénique propre ne soit modifiée de façon semblable, font partie de l'invention. Il en va naturellement de même des séquences nucléotidiques qui peuvent être reconstituées et qui sont capables de coder pour des oligomères tels qu'ils ont été définis ci-après. Les motifs monomères sont liés directement bout à bout ou par l'intermédiaire de séquences peptidiques sans effet sur les propriétés immunogéniques des oligomères ainsi formés.

Des bactéries hébergeant les susdits clones DG 199 et DG 307 ont été déposées à la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris (CNCM), le 22 juillet 1986 respectivement sous les numéros I-580 et I-581. Des bactéries hébergeant le clone DG 145 ont été déposées le 15 septembre 1986 sous le numéro I-606. Les clones DG 536 et DG 729 S ont été respectivement déposés le 17 janvier 1991 sous le numéro I-1027 et le 17 janvier 1991 sous le numéro I-1028

Dans la formule qui précède, il est fait application de la nomenclature internationale désignant chacun des aminoacides naturels par une lettre unique, notamment selon le tableau des correspondances qui suit :

M Méthionine

L	Leucine
I	Isoleucine
V	Valine
F	Phenylalanine
S	Sérine
P	proline
T	Thréonine
A	Alanine
Y	Tyrosine
H	Histidine
Q	Glutamine
N	Asparagine
K	Lysine
D	Acide Aspartique
E	Acide glutamique
C	Cystéine
W	Tryptophane
R	Arginine
G	Glycine

REVENDECATIONS

1. Molécule, ou composition polypeptidique, comportant au moins une séquence peptidique porteuse de tout ou partie, d'un ou plusieurs, épitopes caractéristiques d'une protéine produite dans les hépatocytes infectés par P. falciparum, et plus particulièrement porteuse de tout ou partie d'un, ou plusieurs, épitope(s) T des protéines produites au stade hépatique de P. falciparum, caractérisée en ce que cette séquence peptidique est représentée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

RKADTKKNLERKKEHGDILAEDLYGRLEIP
AIELPSENERGYIIPHQSSLPQDNRGNSRD
SKEISIIIEKTNRESITTNVEGRRDIHKGHL
EEKKDGSIKPEQKEDKS

cet enchaînement d'acides aminés étant, le cas échéant, précédé par toute ou partie d'un ou plusieurs des enchaînements de 17 acides aminés de formule :

X₁DLEQX₂RX₃AKEKLQX₄QQ
QX₁DLEQX₂RX₃AKEKLQX₄Q
QQX₁DLEQX₂RX₃AKEKLQX₄
X₄QQX₁DLEQX₂RX₃AKEKLQ
QX₄QQX₁DLEQX₂RX₃AKEKL
LQX₄QQX₁DLEQX₂RX₃AKEK
KLQX₄QQX₁DLEQX₂RX₃AKE
EKLQX₄QQX₁DLEQX₂RX₃AK
KEKLQX₄QQX₁DLEQX₂RX₃A
AKEKLQX₄QQX₁DLEQX₂RX₃
X₃AKEKLQX₄QQX₁DLEQX₂R
RX₃AKEKLQX₄QQX₁DLEQX₂
X₂RX₃AKEKLQX₄QQX₁DLEQ
QX₂RX₃AKEKLQX₄QQX₁DLE

EQX₂RX₃AKEKLQX₄QQX₁DLLEQX₂RX₃AKEKLQX₄QQX₁DDLEQX₂RX₃AKEKLQX₄QQX₁

dans laquelle :

- . X₁ est "Ser" ou "Arg",
- . X₂ est "Glu" ou "Asp",
- . X₃ est "Arg" ou "Leu",
- . X₄ est "Glu" ou "Gly".

2. Molécule selon la revendication 1, caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

LQEQORDLEQRKADTKKNLERKKEHGDILAEDLYGRLEIP
 AIELPSENERGYIIPHQSSLPQDNRGNSRDSKEISIIKT
 NRESITTNVEGRRDIHKHLEEKKDGSIKPEQKEDKS

3. Molécule selon la revendication 1 ou la revendication 2 caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

DTKKNLERKKEHGDILAEDLYGRLEIP

4. Molécule selon la revendication 1 caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

ERRAKEKLQEQORDLEQRKADTKK

5. Molécule selon la revendication 1 caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHNVEEKVE
 ESVEENDEESVEENVEENVEENDDGSVASSVEESIASSVDESIDSSIEENVAP
 TVEEIVAPTVEEIVAPSVVEKCAPSVVEESVAPSVVEESVAEMLKER

représenté sur la figure 3 et désigné ci-après par le polypeptide 729S.

6. Molécule selon la revendication 1 caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHN

7. Séquence peptidique dérivée d'une molécule selon l'une des revendications 1 à 6, cette séquence présentant des modifications par substitution de 40 % au maximum des acides aminés tout en conservant l'activité biologique de la molécule sus-mentionnée, notamment l'induction d'une réponse des lymphocytes T, en particulier des lymphocytes T cytotoxiques.

8. Composition immunogène caractérisée par l'association d'une molécule conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 7, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

9. Composition de vaccin dirigée contre le paludisme, contenant entre autres principes immunogènes, une molécule conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10. Séquence de nucléotides codant pour une séquence peptidique telle que définie dans la revendication 1.

11. Séquence de nucléotides selon la revendication 10, correspondant selon le code génétique universel à la séquence peptidique telle que définie dans l'une des revendications 2 à 7.

12. Anticorps, polyclonaux ou monoclonaux, reconnaissant spécifiquement les séquences peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

13. Méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par P. falciparum qui comprend la mise en contact d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu avec une composition polypeptidique selon l'une des revendications 1 à 7 dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre

ladite composition polypeptidique et les anticorps éventuellement présents dans le tissu biologique, et la détection in vitro des complexes antigènes-anticorps éventuellement formés.

14. Méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par P. falciparum qui comprend la mise en contact d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu avec des anticorps selon la revendication 12 dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre lesdits anticorps et les protéines spécifiques de P. falciparum éventuellement présentes dans le tissu biologique, et la détection in vitro des complexes antigènes-anticorps éventuellement formés.

15. Coffret ou kit pour le diagnostic in vitro du paludisme selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il comprend :

- une ou plusieurs composition(s) polypeptidique(s) selon l'une des revendications 1 à 7,
- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,
- les réactifs permettant la détection des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où la composition polypeptidique sus-mentionnée n'est pas marquée.

16. Coffret ou kit pour le diagnostic in vitro du paludisme selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il comprend :

- des anticorps selon la revendication 12,

- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,
- les réactifs permettant la détection des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où les anticorps susmentionnés ne sont pas marqués.

17. Vecteur recombinant pour le clonage d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 10 ou 11, et/ou l'expression du polypeptide codé par la susdite séquence contenant un acide nucléique recombinant contenant au moins une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 10 ou 11, dans l'un des sites non essentiel pour sa répllication, le dit vecteur étant notamment de type plasmide, cosmide ou phage et plus particulièrement le plasmide DG536 déposé à la CNCM sous le numéro I-1027 le 17 janvier 1991, ainsi que le plasmide DG729S déposé à la CNCM sous le numéro I-1028 le 17 janvier 1991.

18. Composition pharmaceutique comportant à titre de substance active un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 12 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

19. Utilisation d'une molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour la préparation d'un vaccin destiné à la prévention du paludisme.

19. Utilisation d'un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 12

pour la préparation d'un médicament destiné au
traitement du paludisme.

- les réactifs permettant la détection des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où la composition polypeptidique sus-mentionnée n'est pas marquée, - un tissu ou fluide biologique de référence dépourvu d'anticorps reconnus par la composition polypeptidique sus-mentionnée.

L'invention concerne les anticorps eux-mêmes formés contre les polypeptides de l'invention.

Il va de soi que cette production n'est pas limitée aux anticorps polyclonaux.

Elle s'applique encore à tout anticorps monoclonal produit par tout hybridome susceptible d'être formé, par des méthodes classiques, à partir des cellules spléniques d'un animal, notamment de souris ou de rat, immunisés contre l'un des polypeptides purifiés de l'invention, d'une part et des cellules d'une lignée de cellules d'un myélome approprié d'autre part, et d'être sélectionné, par sa capacité à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant le polypeptide initialement mis en oeuvre pour l'immunisation des animaux.

L'invention vise également une méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par P. falciparum qui comprend la mise en contact d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu avec des anticorps tels que décrits ci-dessus, dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre lesdits anticorps et les protéines

spécifiques de P. falciparum éventuellement présentes dans le tissu biologique, et la détection in vitro des complexes antigènes-anticorps éventuellement formés.

A ce titre l'invention a pour objet un coffret ou kit pour le diagnostic in vitro du paludisme comprenant :

- des anticorps tels que décrits ci-dessus
- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,
- les réactifs permettant la détection des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où les anticorps sus-mentionnés ne sont pas marqués.

L'invention concerne également une sonde nucléotidique de détection caractérisée en ce qu'elle est constituée par tout ou partie d'une des séquences de nucléotides telles que définies ci-dessus de l'invention.

L'invention a plus particulièrement pour objet une méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par P.falciparum qui comprend les étapes suivantes :

- éventuellement l'amplification préalable de la quantité de séquences de nucléotides selon l'invention, susceptibles d'être contenues dans l'échantillon biologique prélevé chez ledit individu, à l'aide de deux amorces d'ADN choisies de la manière indiquée ci-dessus,

- la mise en contact de l'échantillon biologique sus-mentionné avec une sonde nucléotidique telle que définie ci-dessus, dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre ladite sonde et ladite séquence de nucléotides,
- la détection du complexe d'hybridation sus-mentionné éventuellement formé.

A titre d'exemple de sondes nucléotidiques de l'invention, on citera les séquences suivantes :

3'→5' : TTTCGCTAGATCTTGTT et TCTAAATAGAAGAAA

L'invention ouvre surtout la voie à la mise au point de nouveaux principes vaccinaux contre le paludisme issu de l'infection d'un individu par P. falciparum.

L'invention concerne également les compositions préparées sous forme de vaccins contenant soit un ou plusieurs peptides selon l'invention, soit un oligomère de ce ou ces peptides, soit encore un conjugué de ce ou ces peptides ou oligomère avec une molécule porteuse, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable approprié et, le cas échéant, avec d'autres principes actifs vaccinaux contre le paludisme.

Une composition pharmaceutique particulièrement avantageuse, de l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de l'enchaînement peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 200 à 316 de la figure 1, en association avec tout ou partie de la séquence peptidique représentée sur la figure 3.

Des compositions pharmaceutiques avantageuses sont constituées par des solutions, suspensions ou liposomes injectables contenant une dose efficace

d'au moins un produit selon l'invention. De préférence, ces solutions, suspensions ou liposomes sont réalisés dans une phase aqueuse stérilisée isotonique, de préférence saline ou glucosée.

L'invention concerne plus particulièrement de telles suspensions, solutions ou forme liposome qui sont aptes à être administrées par injections intradermiques, intramusculaires ou sous-cutanées, ou encore par scarifications.

Elle concerne également des compositions pharmaceutiques administrables par d'autres voies, notamment par voie orale ou rectale, ou encore sous forme d'aérosols destinés à venir en contact avec des muqueuses, notamment les muqueuses oculaires, nasales, pulmonaires ou vaginales.

En conséquence, elle concerne des compositions pharmaceutiques dans lesquelles l'un au moins des produits selon l'invention se trouve associé à des excipients pharmaceutiquement acceptables, solides ou liquides, adaptés à la constitution de formes orales, oculaires ou nasales, ou avec des excipients adaptés à la constitution des formes d'administration rectale, ou encore avec des excipients gélatineux pour l'administration vaginale. Elle concerne aussi des compositions liquides isotoniques contenant l'un au moins des conjugués selon l'invention, adaptées à l'administration sur les muqueuses, notamment oculaires ou nasales.

Avantageusement, les compositions vaccinales selon l'invention contiennent en outre un véhicule, tel que la polyvinyl-pyrrolidone, facilitant l'administration du vaccin. A la place de la polyvinyl-pyrrolidone, on peut utiliser tout autre

type d'adjuvant au sens classique que l'on donnait autrefois à cette expression, c'est-à-dire d'une substance permettant l'absorption plus aisée d'un médicament ou facilitant son action dans l'organisme. A titre d'exemples d'autres adjuvants de ce dernier type, on mentionnera encore la carboxyméthylcellulose, les hydroxydes et phosphates d'aluminium, la saponine ou tous autres adjuvants de ce type, bien connus de l'homme de l'art. Enfin elles contiennent si besoin un adjuvant immunologique, notamment du type muramylpeptide.

L'invention concerne aussi des compositions pharmaceutiques contenant à titre de substance active l'un au moins des anticorps polyclonaux ou monoclonaux définis précédemment en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention ne se limite évidemment pas aux modes de réalisation décrits ci-dessus à titre d'exemples et l'homme de l'art peut y apporter des modifications sans pour autant sortir du cadre des revendications ci-après ; notamment certains des acides aminés intervenant dans la séquence des peptides selon l'invention peuvent être remplacés par des acides aminés isofonctionnels ou isostériques ; par exemple, une ou plusieurs des substitutions suivantes peuvent être envisagées :

- Glu est substitué par Asp ou Gln,
- Leu est remplacé par Ala, etc...

Il est naturellement bien entendu que les peptides qui résultent de telles substitutions consistent en des équivalents des peptides plus particulièrement revendiqués, dès lors qu'eux-mêmes ou des oligomères ou conjugués formés à partir de ces

peptides présentent des propriétés immunogènes semblables.

L'invention concerne également encore plus particulièrement les "protéines chimères" qui peuvent être obtenues par les techniques du génie génétique, ces protéines chimères pouvant contenir une ou plusieurs des séquences peptidiques de l'invention, et incorporées ou rattachées à un fragment peptidique autre que la β -galactosidase. Ce dernier fragment peptidique a de préférence un poids moléculaire suffisant pour renforcer l'immunogénicité des séquences peptidiques selon l'invention et n'interfère pas du point de vue immunologique avec la manifestation de l'immunogénicité recherchée.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit des conditions dans lesquelles les polypeptides de l'invention ont été obtenus.

Des sérums provenant d'individus européens vivant dans des zones endémiques et suivant une prophylaxie continue avec des médicaments dirigés contre les schizontes des stades sanguins (chloroquine) ont été sélectionnés et testés en utilisant des antigènes du stade sporozoïte, du stade hépatique (antigène LS), et des stades sanguins. La plupart de ces sérums réagissent avec les antigènes de tous les stades probablement car la prophylaxie a été interrompue. Trois sérums prélevés à partir d'individus ayant résidé en Afrique tropicale rurale et ayant ingéré 100 μ g de chloroquine par jour sans interruption pendant 23 à 26 ans, ne réagissent pas avec les antigènes des stades sanguins suivant le test d'immunofluorescence (IFA). Ces trois sérums

possédant toutefois des titres élevés en anticorps dirigés contre les sporozoïtes et les protéines LS (dilution IFA 1/3200 et 1/6400 respectivement).

Un des trois sérums précédents, de spécificité réduite, a été utilisé pour cribler une banque d'ADN génomique construite dans le bactériophage λ gt 11 de la manière suivante :

1) CONSTRUCTION DE LA BANQUE D'ADN GENOMIQUE DE Plasmodium falciparum.

L'ADN génomique du clone 96 de la souche thaïlandaise Tak9 de P.falciparum (Science, 212, 1.37-1.38 (1981) a été isolé par les techniques classiques.

Des échantillons de 18 μ g d'ADN de P.falciparum ont été incubés à 15°C dans un tampon 50 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM $MnCl_2$, 20 μ g/ml de sérum albumine bovine, avec des quantités respectives d'ADNase I (Boehringer Mannheim) de 5 pg pendant 5 minutes ou bien de 3.5 pg pendant 5 ou 10 minutes. Après addition de 5 mM EDTA (Ethylenediamine tetracétique acide), les échantillons d'ADN sont réunis et purifiés par extraction au mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 V/24 V/1 V) puis par l'éther. L'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol à -20°C en présence de 2.5 M d'acétate d'ammonium.

45 μ g d'ADN ainsi traité ont été méthylés par 180 U d'Eco R1 méthylase (Biolabs) dans les conditions recommandées par le fournisseur, avec l'addition supplémentaire de 5 mM DTT (dithiothreitol), pendant 15 minutes à 37°C. Après purification de l'ADN comme ci-dessus, 10 μ g d'ADN ont été incubés avec 40 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM

sulfate d'ammonium, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA, 0.05 mM NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) 0.1 mM dXTP (comprenant les 4 desoxynucleotides triphosphates dATP, dCTP, dGTP et dTTP), en présence de 10 U T4 ADN polymérase (PL Biochemicals) et de 10 U de E. coli ADN ligase (Biolabs). L'ADN a été purifié et concentré comme ci-dessus.

8 µg d'ADN ont alors été ligaturés avec 0.4 µg d'un adaptateur ou "linker" Eco R1 (adaptateurs phosphorylés Eco R1 commercialisés par Biolabs) par 4 U T4 ADN ligase (Biotec) dans le tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml sérum albumine bovine.

Après incubation à 4°C pendant 5 heures, on ajoute 2 U T4 ADN ligase et la réaction est poursuivie à 4°C pendant 16 heures. Le tube est soumis à plusieurs cycles de congélation à -80°C/décongélation pour arrêter la réaction. L'ADN est ensuite dilué et le tampon d'incubation ajusté de façon à obtenir les conditions recommandées par le fournisseur pour l'utilisation de l'enzyme Eco R1. 100 U d'enzyme Eco R1 (Promega Biotec) sont ajoutées et incubées pendant 3 heures à 37°C. La réaction est arrêtée par un chauffage de 10 minutes à 60°C, et l'ADN est purifié et concentré comme ci-dessus.

L'ADN est resuspendu dans 100 µl de tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, et déposé sur un gradient 5-20 % de saccharose préparé en 25 mM acétate de sodium, 10 mM EDTA et centrifugé dans le rotor Beckman SW 50.1 à 45,000 tours par minute pendant 150 minutes.

Les fractions sont analysées sur gel d'agarose et celles qui contiennent les fragments d'ADN de tailles comprises entre environ 300 pb. et 2 500 pb. sont rassemblées, dialysées contre le tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA à 4°C. L'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol. Environ 400 ng de cet ADN ont été ligaturés à 1 µg d'ADN du vecteur λgt11 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 1194-1198 (1983)) coupé par Eco R1 et déphosphorylé (Protoclone de Promega Biotec), dans un volume de 10 µl, (en tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml sérum albumine bovine) par 1 U T4 ADN ligase (Biotec).

Les produits de ligature ont été encapsidés in vitro dans les extraits d'E. coli préparés à partir des souches bactériennes construites par B. Hohn (Methods Enzymol. 68, 299), selon la technique décrite par Maniatis et coll. (Molecular cloning, a laboratory manual, p. 264, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)).

Environ 7 millions de bactériophages recombinants ont été obtenus.

2) CRIBLAGE IMMUNOLOGIQUE DE LA BANQUE

Les bactériophages recombinants ont été étalés sur un milieu de culture contenant la bactérie indicatrice Y 1090, à une densité de 50,000 plages par boîte de Pétri de 90 mm, et incubés à 42°C pendant 3 heures.

Un filtre de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, BA 85) saturé par 0,01 M IPTG isopropyl-b-thiogalactopyranoside (Sigma) est déposé sur les boîtes, qui sont incubées à 37°C pendant 3 heures. Au terme de ces incubations, les filtres de

nitrocellulose sont prélevés, et les boîtes de Pétri conservées à 4°C.

Les filtres de nitrocellulose sont placés dans un bain de tampon TL : 50 mM tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 % lait écrémé, 0.05 % Tween 20 (Sigma). Les filtres sont incubés 15 heures à 4°C en tampon TL, puis 2 fois 15 minutes à 20°C. Ils sont alors incubés pendant une heure avec un pool d'antisérums humains immuns dirigés contre les antigènes de tous les stades de développement de P. falciparum, traité au préalable pour le dépler en anticorps anti-E.coli selon la technique décrite par Ozaki et coll. (J. Immunol. Methods, 89, 213-219, 1986). Le pool d'antisérums humains a été utilisé à la dilution 1/200, en tampon TL. L'incubation a été faite à 20°C pendant 1 heure. Les filtres ont été lavés 4 fois avec le tampon TL, puis incubés avec des anticorps anti-immunoglobulines humaines conjugués à la peroxydase de raifort (Biosys) et iodines à l'iode ¹²⁵I, pendant 1 heure à 20°C. Après plusieurs lavages en tampon TL, puis en tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, l'activité enzymatique de la peroxydase est révélée (Ozaki et coll, précédemment cité), les filtres sont séchés à l'air libre et autoradiographiés sur film Kodak Royal X-OMat AR, avec un écran amplificateur.

Une collection d'environ 1 200 clones de bactériophages recombinants a été constituée en prélevant les plages de lyse correspondant aux signaux positifs. Ces clones ont été ensuite soumis à un second cycle de criblage immunologique, en employant cette fois un des trois sérums humains précédemment décrits et présentant pas ou peu

d'anticorps dirigés contre les formes érythrocytaires de P. falciparum et un titre élevé contre les formes sporozoïte et hépatique du parasite (formes pré-érythrocytaires). Ce criblage immunologique a été effectué selon le protocole décrit ci-dessus. Ce sérum a conduit à identifier environ 120 clones recombinants parmi 1200 testés.

Les anticorps humains qui réagissent avec les déterminants antigéniques exprimés par les clones recombinants ont été purifiés par affinité sur les protéines recombinantes, selon la technique décrite par Ozaki et coll. (précédemment cité). Ces anticorps spécifiques ont été incubés avec des préparations de parasites à différents stades de développement (sporozoïte, stade hépatique ou stades érythrocytaires), et la réaction a été étudiée par immunofluorescence indirecte.

Les clones recombinants sur lesquels sont retenus par affinité des anticorps spécifiques du stade hépatique, et donc qui expriment des déterminants propres à ce stade ont été étudiés : il s'agit des clones DG 307, DG 199 et DG 145. Ces anticorps spécifiques de ces trois clones réagissent spécifiquement avec les schizontes hépatiques, tels que l'on peut les obtenir après infection d'hépatocytes humains ou de singes par des sporozoïtes de P.falciparum ; la localisation de la fluorescence a été déterminée comme étant identique à celle considérée caractéristique de LSA.

La spécificité d'espèce et de stade des 3 clones DG 145, DG 199, et DG 307 a été testée de la manière suivante. Premièrement, il a été déterminé que les mêmes anticorps purifiés par affinité et qui

réagissent par IFA (ou encore qui sont IFA positifs) avec LSA, ne réagissent pas avec des préparations de sporozoïtes sèches ou humides, ni avec les antigènes des stades sanguins, qu'ils soient testés par IFA avec des parasites fixés à l'acétone, ou par immunotransfert (immunoblotting) en utilisant des protéines de tous les stades extraites au SDS. Les anticorps purifiés par affinité ne réagissent pas avec les antigènes de stade hépatique de P. yoelii, ni avec les schizontes hépatiques de P. vivax préparés à partir de singes Saimiri sciureus.

Deuxièmement, les protéines recombinantes de DG 145, DG 199 et DG 307 ne réagissent pas avec les sérums provenant de deux patients atteints de malaria (paludisme causé par P. falciparum) par transfusion accidentelle et qui, par définition n'ont donc pas d'anticorps contre les antigènes spécifiques des stades précédents (sporozoïtes et antigènes du stade hépatique). Ces protéines ne réagissent pas avec deux anticorps monoclonaux reconnaissant le tétrapeptide CS, avec les sérums de souris immunisées avec les antigènes CS recombinants R32t et 32 (Science, 228, 958 (1985)). De plus, les protéines recombinantes n'ont pas réagi avec des antisérums humains dirigés contre P. vivax (bien que les sérums furent positifs avec les schizontes hépatiques de P. vivax), P. ovale et P. cynomolgi (Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 60, 348 (1980)) quand elles sont testées par la technique de taches d'immunotransfert (immunodot blots), alors qu'elles sont positives avec tous les sérums humains anti-P. falciparum testés.

Au sein de cette sous-population de 120 clones sus-mentionnée, une technique de criblage

immunologique par des anticorps purifiés par affinité sur le clone DG307 (ou 145, ou 199) conduit à la détection de 40 clones environ sur 120 présentant apparemment l'épitope caractéristique du LSA et défini par la structure de base de 17 acides aminés citée plus haut.

De même des techniques d'identification par hybridation à l'aide de fragments d'ADN des mêmes clones (DG307) permettent d'identifier ces structures répétées dans les mêmes clones que ceux identifiés par les tests immunologiques.

Un criblage complémentaire du sous-ensemble de 40 clones appartenant à cette famille de l'antigène LSA a été utilisé pour identifier d'autres parties du gène comportant des séquences distinctes de celles définies par les répétitions de 17 acides aminés. Pour ce criblage complémentaire, des sérums identifiés comme ne réagissant pas avec les répétitions des 17 acides aminés, mais positifs en immunofluorescence indirecte avec la structure périphérique du schizonte hépatique où est situé l'antigène LSA, ont été employés. Au sein de la famille des 40 clones du LSA, ces sérums ont été trouvés positifs pour plusieurs d'entre eux, et l'un des clones comportant le plus grand insert, dénommé DG536, a été sélectionné et étudié en détail.

L'insert de 951 paires bases a été purifié et recloné dans le bactériophage M13 mp19. La séquence d'ADN et l'organisation génomique du gène LSA ont alors été déterminées. La figure 1 montre que le clone comporte à l'extrémité 5' une séquence de 209 acides aminés correspondant à une série des 12 répétitions de 17 acides aminés, similaire à celle

décrite dans l'article de Guérin-Marchand et coll. (Nature, sus-mentionné) et comporte ensuite une série de 106 acides aminés dont la structure est non répétitive.

Ainsi qu'on le voit dans la figure 1, le motif de 17 acides aminés est dans deux répétitions (cf. motif correspondant aux positions 35 à 51, et celui correspondant aux positions 137 à 153 de la figure 1) identique à celui décrit dans l'article de Guérin-Marchand et coll. et les autres répétitions présentent une substitution d'une leucine par une arginine (cf. positions 8, 59, 76, 110, 127, 161, 178 et 195 de la figure 1), une substitution d'un acide glutamique par un acide aspartique (cf. positions 23 et 91 de la figure 1), ainsi qu'une substitution d'une sérine par une arginine (cf. position 205 de la figure 1).

La taille de la protéine native du LSA dans le parasite a pu être mesurée au prix de grandes difficultés. Des schizontes hépatiques de P. falciparum ont été produits in vitro par infection d'hépatocytes humains de primo culture avec des glandes salivaires de moustiques contenant des sporozoïtes selon la technique décrite dans Mazier et coll. (Science n°227, p440, 1985). Après 7 jours de culture, les cellules infectées sont recueillies et utilisées pour préparer un extrait analysé en gel de polyacrylamide contenant du SDS et transféré sur nitrocellulose. Les antigènes hépatiques sont ensuite révélés par un anticorps purifié par affinité sur les répétitions du 17 acides aminés déjà cités du LSA. Ces anticorps marquent une protéine de poids moléculaire de 200 000 Daltons.

L'hybridation du clone DG307 avec les fragments d'ADN de P. falciparum obtenus par digestion avec une enzyme de restriction, la Mung Bean nucléase, selon les conditions décrites par McCutchans (NAR, 16, 14, 6883-6896, 1988), capable de couper chaque extrémité des gènes du parasite, révèle une bande unique d'un poids moléculaire de 5 Kbases cohérent avec la taille de la protéine native mesurée dans l'extrait parasitaire.

En microscopie électronique des schizontes hépatiques obtenus par injection de sporozoites de chimpanzés, le marquage des anticorps anti-LSA purifiés par affinité, visualisés par un deuxième anticorps marqué à l'or colloïdal, révèle que la molécule LSA est distribuée : a) au stade du trophozoite hépatique et du schizonte jeune, dans des vacuoles contenant des granules qui s'ouvrent et se déversent dans la vacuole parasitophore, b) au stade du schizonte sub-mature âgés de 5 jours, en périphérie du schizonte hépatique dans les granules présents dans la vacuole parasitophore du parasite, c) chez les schizontes mûrs âgés de 6 jours à 7 jours, dans la vacuole parasitophore ainsi qu'entre les pseudo-cytomères du schizonte, puis finalement autour des mérozoites en formation.

L'étude de la réponse immunologique de sujets exposés au paludisme ainsi que d'animaux immunisés avec les protéines recombinantes et/ou synthétiques, permet de préciser la fonction biologique de la protéine LSA et de certains segments de cette protéine en particulier ceux contenus dans les peptides synthétiques.

L'immunisation de souris par les protéines LSA-R-NR et l'étude de la réponse des lymphocytes de ces souris, ainsi que l'immunisation par les peptides LSA-R de souris de différents haplotypes par des peptides LSA-R, LSA-J et LSA-NR et enfin l'étude des réponses des lymphocytes des sujets exposés au paludisme vis-à-vis des peptides LSA-R, indiquent qu'aucun épitope T pour l'homme et la souris n'est défini par la partie répétée de la molécule LSA. Par contre, ainsi qu'il avait été indiqué précédemment, ces régions constituent un excellent épitope B pour l'homme ou la souris, défini par la partie répétée de la molécule LSA, et les résultats complémentaires obtenus depuis chez plus de 500 individus exposés au paludisme indiquent que cet épitope est reconnu par les anticorps de près de 95 % des sujets étudiés, au Sénégal, en Haute Volta, à Madagascar et au Kenya.

L'étude préliminaire des lymphocytes de 5 sujets africains adultes exposés au paludisme, ainsi que des lymphocytes de chimpanzés (*Pan troglodytes*) immunisés par la protéine recombinante LSA-R-NR (clone DG536), révèle qu'un épitope T de la molécule LSA est défini par la séquence d'acides aminés contenue dans le peptide synthétique LSA-NR. Un autre épitote T pourrait être contenu dans les séquences du peptide synthétique LSA-J. Des réponses prolifératives des lymphocytes humains et des lymphocytes de chimpanzé immunisé ont été observées après stimulation par ces deux peptides, a) chez le chimpanzé les lignées lymphocytaires obtenues sont à 60% du phénotype CD8+, b) chez la souris, l'injection de l'un ou l'autre de ces peptides permet de "primer" immunologiquement le système immunitaire de la souris et d'obtenir la

production à taux élevé d'anticorps contre l'épitope B du peptide LSA-R après l'injection de la protéine recombinante LSA-R-NR. L'identification de ces épitopes capables de stimuler les lymphocytes T a une grande importance dans la mesure où il a été établi dans le paludisme des rongeurs que la protection induite par des sporozoites irradiés repose sur la production de lymphocytes cytotoxiques pour l'hépatocyte infecté, et capable de les détruire.

En outre, l'étude de 230 sérums de sujets africains indique aussi que le peptide LSA-NR définit un épitope B, distinct de celui que l'on trouve dans les répétitions, reconnu par environ 65 % des sujets étudiés.

L'intérêt potentiel des épitopes T du LSA, en particulier, ceux contenus dans la partie non répétée, est en outre fortement renforcé par les résultats obtenus chez le chimpanzé:

chez le chimpanzé ayant été immunisé par 3 injections à 15 jours d'intervalles d'un mélange de deux protéines recombinantes adsorbées sur alun, d'une part la protéine recombinante LSA-R-NR (clone DG536), et d'autre part la protéine recombinante dénommée DG729S (clone DG729S faisant partie des 120 clones sus-mentionnés), plusieurs résultats importants ont pu être obtenus:

- une production d'anticorps spécifiques de chacune des deux molécules recombinantes, c'est-à-dire réagissant avec la protéine LSA-R-NR et les peptides synthétiques, ainsi qu'avec la protéine recombinante 729S, a été détectée.

- une réponse proliférative spécifique des lymphocytes a été obtenue vis-à-vis du peptide LSA-

NR, et également du peptide LSA-J. Les lymphocytes proliférant sont pour 60% d'entre eux de phénotype CD8+, qui correspond en particulier à des cellules T cytotoxiques.

- Après immunisation des chimpanzés, une épreuve d'infection par injection intraveineuse de 28 millions de sporozoites de P. falciparum a été réalisée chez un chimpanzé immunisé et chez un chimpanzé témoin (ayant reçu une protéine témoin recombinante non apparentée), et des biopsies hépatiques ont été réalisées au 6ème jour après infection. L'examen des biopsies montre l'existence d'une réaction cellulaire, lympho-monocytaire, autour des schizontes hépatiques, infiltrant ces schizontes, et capables de les détruire. De telles images n'ont pas été observées chez le chimpanzé ayant reçu l'antigène contrôle.

Cette réaction cellulaire témoigne de l'existence d'épitopes T dans les molécules injectées 729 S et LSA-R-NR (DG 536), capables d'être exprimés dans les molécules injectées, capables d'être exprimés par les schizontes hépatiques, et d'induire un afflux cellulaire ; ce résultat est en accord avec les résultats des tests de prolifération lymphocytaires ; enfin il indique que la réponse immunitaire induite par les protéines recombinantes injectées est capable lors de la pénétration du parasite d'induire un afflux cellulaire, lui-même capable de concourir à la défense de l'organisme, en détruisant les parasites en position intra-hépatocytaire.

Les spécificités antigéniques et/ou immunologiques des polypeptides de l'invention sont les suivantes :

- le polypeptide 536 :
 - * est reconnu :
 - . par des anticorps provenant de sujets ayant le paludisme,
 - . par des sérums de chimpanzés immunisés avec la protéine 536 complète recombinante,
 - * co-réagit avec les polypeptides décrits dans Guérin-Marchand et al (Nature sus-mentionné) par l'intermédiaire des séquences répétitives,
 - * induit la formation d'anticorps (présence d'épitopes B)
 - * induit des réponses prolifératives de lymphocytes T (présence d'épitope T) chez le chimpanzé et chez l'homme.
 - le polypeptide NR comprend un épitope T important et un épitope B pour l'homme comme pour l'animal immunisé (souris et chimpanzé)
 - le polypeptide LSA-J comprend un épitope B distinct de celui de la répétition de 17 acides aminés probablement en raison de la substitution de S par R, et comprend un épitope T reconnu chez l'homme et le chimpanzé.
- La protéine recombinante 729 S :
- est reconnue :
 - * par des anticorps de sujets exposés au paludisme,
 - * par des serum de chimpanzés, et de souris, immunisés par la protéine 729 S

- est mieux reconnue par les individus capables de résister à l'impadulation que par ceux qui n'y résistent pas (au nord du Sénégal, les inventeurs ont administré une cure radicale de chloroquine à 100 individus, et suivi pendant la période de transmission, de septembre à décembre, la re-positivation du sang a) chez les sujets qui se sont positivés, aucun anticorps contre la protéine 729 S n'a été détecté b) chez plus de la moitié de ceux qui ne se sont pas re-positivés, il existait une réponse à taux élevé contre la protéine 729 S).

Il apparaîtra immédiatement à l'homme de métier que dans les séquences nucléiques sus-mentionnées, certains des nucléotides peuvent être remplacés par d'autres en raison de la dégénérescence du code génétique sans que pour autant les peptides codés ne soient modifiés. Toutes ces séquences nucléotidiques, ainsi que celles qui codent pour des polypeptides qui diffèrent des précédents par un ou plusieurs acides aminés sans que leur activité immunogénique propre ne soit modifiée de façon semblable, font partie de l'invention. Il en va naturellement de même des séquences nucléotidiques qui peuvent être reconstituées et qui sont capables de coder pour des oligomères tels qu'ils ont été définis ci-après. Les motifs monomères sont liés directement bout à bout ou par l'intermédiaire de séquences peptidiques sans effet sur les propriétés immunogéniques des oligomères ainsi formés.

Des bactéries hébergeant les susdits clones DG 199 et DG 307 ont été déposées à la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris (CNCM), le 22 juillet

1986 respectivement sous les numéros I-580 et I-581. Des bactéries hébergeant le clone DG 145 ont été déposées le 15 septembre 1986 sous le numéro I-606. Les clones DG 536 et DG 729 ont été respectivement déposés le 17 janvier 1991 sous le numéro I-1027 et le 17 janvier 1991 sous le numéro I-1028.

Dans la formule qui précède, il est fait application de la nomenclature internationale désignant chacun des aminoacides naturels par une lettre unique, notamment selon le tableau des correspondances qui suit :

M	Méthionine
L	Leucine
I	Isoleucine
V	Valine
F	Phénylalanine
S	Sérine
P	Proline
T	Théorine
A	Alanine
Y	Tyrosine
H	Histidine
Q	Glutamine
N	Asparagine
K	Lysine
D	Acide Aspartique
E	Acide glutamique
C	Cystéine
W	Tryptophane
R	Arginine
G	Glycine

REVENDECATIONS

1. Molécule, ou composition polypeptidique, comportant au moins une séquence peptidique porteuse de tout ou partie, d'un ou plusieurs, épitopes caractéristiques d'une protéine produite dans les hépatocytes infectés par P. falciparum, et plus particulièrement porteuse de tout ou partie d'un, ou plusieurs, épitope(s) T des protéines produites au stade hépatique de P. falciparum, caractérisée en ce que cette séquence peptidique est représentée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

RKADTKKNLERKKEHGDILAEDLYGRLEIP
AIELPSENERGYIYPHQSSLPQDNRGNSRD
SKEISIIIEKTNRESITTNVEGRRDIHKGHL
EEKKDGSIKPEQKEDKS

cet enchaînement d'acides aminés étant, le cas échéant, précédé par toute ou partie d'un ou plusieurs des enchaînements de 17 acides aminés de formule :

X₁DLEQX₂RX₃AKEKLQX₄QQ
QX₁DLEQX₂RX₃AKEKLQX₄Q
QQX₁DLEQX₂RX₃AKEKLQX₄
X₄QQX₁DLEQX₂RX₃AKEKLQ
QX₄QQX₁DLEQX₂RX₃AKEKL
LQX₄QQX₁DLEQX₂RX₃AKEK
KLQX₄QQX₁DLEQX₂RX₃AKE
EKLQX₄QQX₁DLEQX₂RX₃AK
KEKLQX₄QQX₁DLEQX₂RX₃A
AKEKLQX₄QQX₁DLEQX₂RX₃
X₃AKEKLQX₄QQX₁DLEQX₂R
RX₃AKEKLQX₄QQX₁DLEQX₂
X₂RX₃AKEKLQX₄QQX₁DLEQ

QX₂RX₃AKEKLQX₄QQX₁DLE
 EQX₂RX₃AKEKLQX₄QQX₁DL
 LEQX₂RX₃AKEKLQX₄QQX₁D
 DLEQX₂RX₃AKEKLQX₄QQX₁

dans laquelle :

- . X₁ est "Ser" ou "Arg",
- . X₂ est "Glu" ou "Asp",
- . X₃ est "Arg" ou "Leu",
- . X₄ est "Glu" ou "Gly".

2. Molécule selon la revendication 1, caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

LQEQQRDLEQRKADTKKNLERKKEHGDILAEDLYGRLEIP
 AIELPSENERGYYPHQSSLPQDNRGNSRDSKEISIIIEKT
 NRESITTNVEGRDDIHKHLEEKDGSIKPEQKEDKS

3. Molécule selon la revendication 1 ou la revendication 2 caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

DTKKNLERKKEHGDILAEDLYGRLEIP

4. Molécule selon la revendication 1 caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

ERRAKEKLQEQQRDLEQRKADTKK

5. Molécule selon la revendication 1 caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHNVEEKVE
 ESVEENDEESVEENVEENVEENDDGSVASSVEESIASSVDESIDSSIEENVAP
 TVEEIVAPTVEEIVAPSVVEKCAPSVVEESVAPSVVEESVAEMLKER

représenté sur la figure 3 et désigné ci-après par le polypeptide 729S.

6. Molécule selon la revendication 1 caractérisée par tout ou partie de l'enchaînement d'acides aminés suivant :

RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHN

7. Séquence peptidique dérivée d'une molécule selon l'une des revendications 1 à 6, cette séquence présentant des modifications par substitution de 40% au maximum des acides aminés tout en conservant l'activité biologique de la molécule sus-mentionnée, notamment l'induction d'une réponse des lymphocytes T, en particulier des lymphocytes T cytotoxiques.

8. Composition immunogène caractérisée par l'association d'une molécule conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 7, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

9. Composition de vaccin dirigée contre le paludisme, contenant entre autres principes immunogènes, une molécule conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10. Séquence de nucléotides codant pour une séquence peptidique telle que définie dans la revendication 1.

11. Séquence de nucléotides selon la revendication 10, correspondant selon le code génétique universel à la séquence peptidique telle que définie dans l'une des revendications 2 à 7.

12. Anticorps, polyclonaux ou monoclonaux, reconnaissant spécifiquement les séquences peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

13. Méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par

P. falciparum qui comprend la mise en contact d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu avec une composition polypeptidique selon l'une des revendications 1 à 7 dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre ladite composition polypeptidique et les anticorps éventuellement présents dans le tissu biologique, et la détection in vitro des complexes antigènes-anticorps éventuellement formés.

14. Méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par P. falciparum qui comprend la mise en contact d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu avec des anticorps selon la revendication 12 dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre lesdits anticorps et les protéines spécifiques de P. falciparum éventuellement présentes dans le tissu biologique, et la détection in vitro des complexes antigènes-anticorps éventuellement formés.

15. Coffret ou kit pour le diagnostic in vitro du paludisme selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il comprend :

- une ou plusieurs composition(s) polypeptidique(s) selon l'une des revendications 1 à 7,
- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,
- les réactifs permettant la détection des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus

particulièrement dans le cas où la composition polypeptidique sus-mentionnée n'est pas marquée.

16. Coffret ou kit pour le diagnostic in vitro du paludisme selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il comprend :

- des anticorps selon la revendication 12,
- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,
- les réactifs permettant la détection des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où les anticorps sus-mentionnés ne sont pas marqués.

17. Vecteur recombinant pour le clonage d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 10 ou 11, et/ou l'expression du polypeptide codé par la susdite séquence contenant un acide nucléique recombinant contenant au moins une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 10 ou 11, dans l'un des sites non essentiel pour sa réplication, le dit vecteur étant notamment de type plasmide, cosmide ou phage et plus particulièrement le plasmide DG536 déposé à la CNCM sous le numéro I-1027 le 17 janvier 1991, ainsi que le plasmide DG729S déposé à la CNCM sous le numéro I-1028 le 17 janvier 1991.

18. Composition pharmaceutique comportant à titre de substance active un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 12 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

19. Utilisation d'une molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour la préparation d'un vaccin destiné à la prévention du paludisme.

20. Utilisation d'un ou plusieurs anticorps policlonaux ou monoclonaux selon la revendication 12 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du paludisme.

(5') 1 SDLEQERRAKEKLQEQQ
18 SDLEQDRLAKEKLQEQQ
35 SDLEQERLAKEKLQEQQ
52 SDLEQERRAKEKLQEQQ
69 SDLEQERRAKEKLQEQQ
86 SDLEQDRLAKEKLQEQQ
103 SDLEQERRAKEKLQEQQ
120 SDLEQERRAKEKLQEQQ
137 SDLEQERLAKEKLQEQQ
154 SDLEQERRAKEKLQEQQ
171 SDLEQERRAKEKLQEQQ
188 SDLEQERRAKEKLQEQQ
205 RDLEQ

210 RKADTKKNLERKKEHGDILAEDLYGRLEIP
240 AIELPSENERGYYPHQSSLPODNRGNSRD
270 SKEISIIKTNRESITTNVEGRDIIHKGHL
300 EEKKDGSIKPEQKEDKS 316 (3')

FIGURE 1

(5') 1 AAAGCGATCTAGAAACAAGAGAGACGTGCTAAAGAAAAAGTTGCAAGAACAAC
 52 AAAGCGATTTAGAACAAAGA TAGAC TTGCTAAAGAAAAAGTTACAAGAGCAGC
 103 AAAGCGATTTAGAACAAAGAGAGAC TTGCTAAAGAAAAAGTTGCAAGAACAAC
 154 AAAGCGATCTAGAACAAAGAGAGACGTGCTAAAGAAAAAGTTGCAAGAACAAC
 205 AAAGCGATTTAGAACAAAGAGAGACGTGCTAAAGAAAAAGTTGCAAGAACAAC
 256 AAAGCGATTTAGAACAAAGA TAGAC TTGCTAAAGAAAAAGTTACAAGAGCAGC
 307 AAAGCGATTTAGAACAAAGAGAGACGTGCTAAAGAAAAAGTTGCAAGAACAAC
 358 AAAGCGATTTAGAACAAAGAGAGACGTGCTAAAGAAAAAGTTGCAAGAACAAC
 409 AAAGCGATTTAGAACAAAGAGAGAC TTGCTAAAGAAAAAGTTGCAAGAACAAC
 460 AAAGCGATTTAGAACAAAGAGAGACGTGCTAAAGAAAAAGTTGCAAGAACAAC
 511 AAAGCGATTTAGAACAAAGAGAGACGTGCTAAAGAAAAAGTTGCAAGAACAAC
 562 AAAGCGATTTAGAACAAAGAGAGACGTGCTAAAGAAAAAGTTGCAAGAACAAC
 613 AAAGAGATTTAGAACAA
 630 AGGAAGGCTGATACGAAAAAAATTTAGAAAGAAAAAGGAACATGGAGAT
 681 AT AT TAGCAGAGGATTTA TATGGTCGTTTAGAAAT ACCAGCTAT AGAACTT
 732 CCA TCAGAAATGAACGTGGATAT TATAT ACCACATCAA TCTTCTT TACCT
 783 CAG GACAAACAGAGGGAATAGTAGAGATTCCAAGGAAATATCTAT AA TAGAA
 834 AAA ACAA TAGAGAA TCTAT TACAACAAATGTTGAAGGACGAAAGGGATATA
 885 CAT AAAGGACATCT TGAAGAAAAAGAAAGATGTTCAATAA ACCAGAACAA
 936 AAAGAAGA TAAAT CT 950 (3')

FIGURE 2

RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQ
HNVEEKVEESVEENDEESVEENVEENVEENDDDGSSVASSVEESI
ASSVDESIDSSIEENVAPTVEEIVAPTVEEIVAPSVVEKCAPSVE
ESVAPSVVEESVAEMLKER

FIGURE 3

5' GAA TTC CGT GAT GAA CTT TTT AAT GAA TTA TTA AAT AGT GTA GAT
GTT AAT GGA GAA GTA AAA GAA AAT ATT TTG GAG GAA AGT CAA GTT AAT
GAC GAT ATT TTT AAT AGT TTA GTA AAA AGT GTT CAA CAA GAA CAA CAA
CAC AAT GTT GAA GAA AA AGT TGA AGA AAG TGT AGA AGA AA ATG ACG
AAG AAA GTG TAG AAG AAA ATG TAG AAG AAA ATG TAG AAG AAA ATG
ACG ACG GAA GTG TAG CCT CAA GTG TTG AAG AAA GTA TAG CTT CAA GTG
TTG ATG AAA GTA TAG ATT CAA GTA TTG AAG AAA ATG TAG CTC CAA CTG
TTG AAG AAA TCG TAG CTC CAA CTG TTG AAG AAA TTG TAG CTC CAA GTG
TTG TAG AAA AGT GTG CTC CAA GTG TTG AAG AAA GTG TAG CTC CAA GTG
TTG AAG AAA GTG TAG CTG AAA TGT TGA AGG AAA GGA ATT C 3'

FIGURE 4